



Liliana Sofia
Batista do Nascimento ***O mutante S. cerevisiae* em 5 Factores de**
Transcrição da Família Yap



**Liliana Sofia
Batista do Nascimento** ***O mutante S. cerevisiae* em 5 Factores de
Transcrição da Família Yap**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Claudina Amélia Marques Rodrigues-Pousada, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.

Aos meus Pais

o júri

presidente

Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

vogais

Professor Doutor João Carlos Serafim Varela
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente da Universidade do Algarve
(Arguente)

Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada
Professora Catedrática da Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

A primeira pessoa a quem quero prestar o meu profundo agradecimento é à minha professora, Claudina Rodrigues-Pousada, pelo carinho, apoio e confiança depositados em mim. Muito obrigado por me ter aceite no seu laboratório, permitindo-me dar os primeiros passos no mundo da ciência.

Quero também agradecer de uma forma muito especial à Regina e à Tracy pelo empenho, disponibilidade e paciência na minha aprendizagem das diversas técnicas e esclarecimento de dúvidas. Muito obrigado pelo vosso apoio e atenção.

Patrícia e Rute, obrigado pelos bons momentos, boa disposição e principalmente pela vossa amizade.

À Catarina Pimentel, à Manuela e à Rute Rodrigues pelas conversas amenas, ótimo convívio e companheirismo.

Ao Jorge e à Catarina pelo apoio, sugestões e boa convivência ao longo deste mestrado.

Ao meu irmão, pela sua presença, paciência e entusiasmo sempre que precisei.

Aos meus tios pela sua incondicional preocupação com o meu bem-estar durante a minha estadia em Lisboa.

Ao David pelo apoio constante, compreensão e incentivo. Muito obrigada!

Finalmente, quero agradecer aos meus Pais pelos valores que sempre me transmitiram, pelo apoio e incentivo incondicionais. Para vós um muito obrigado por tudo o que me têm proporcionado. Desejo conseguir fazer-vos felizes e orgulhosos. Mãe, muito obrigado pelas palavras de alento e força nos momentos mais difíceis.

palavras-chave

Saccharomyces cerevisiae; resposta ao stress; Yap; disrupção de genes; análise funcional

resumo

A capacidade que os organismos possuem para alterar os seus padrões de expressão de genes em resposta a mudanças do meio ambiente é essencial para a sua viabilidade. A levedura é um dos organismos que está continuamente exposto a mudanças rápidas e drásticas no seu meio externo. *Saccharomyces cerevisiae*, em particular, possui um programa complexo e muito flexível de expressão de genes, quando exposta a mudanças agressivas do seu meio ambiente. As células mantêm a sua homeostase através de mecanismos coordenados de regulação de vários factores de transcrição, cada um deles desempenhando funções específicas. As proteínas bZip formam uma das maiores famílias de factores de transcrição nas células eucariontes. A *S. cerevisiae* contém uma família de oito proteínas bZip, designadas por proteínas Yap (Yap1-8) que regulam genes específicos envolvidos na resposta aos vários tipos de stress tais como o stress oxidativo, stress osmótico, stress aos compostos de arsénio e drogas, stress térmico, entre outros. Os dados existentes acerca dos membros da família Yap tanto indicam a existência de funções coincidentes entre eles como indicam papéis fisiológicos diferentes. Além disso, alguns dados evidenciam o cruzamento de informação entre os vários factores de transcrição Yap. O duplo mutante *yap1yap2*, por exemplo, é mais sensível ao cádmio, bem como o *yap1yap8* é mais sensível aos compostos de arsénio que o mutante individual, respectivamente. De acordo com o descrito, o desafio deste estudo foi portanto a construção de de estirpes mutadas para os vários genes YAP, o que pode revelar-se uma ferramenta valiosa para o estudo funcional de cada membro da família Yap. O trabalho presente baseou-se na optimização e combinação de um conjunto de técnicas, tais como, métodos de PCR de disrupção de genes, sistema Cre/loxP e análise de tetradas, com o objectivo de disromper os vários genes YAP e avaliar fenotipicamente a viabilidade dos diferentes mutantes.

keywords

Saccharomyces cerevisiae; stress response; Yap; gene disruption; functional analysis.

abstract

The ability of organisms to alter their gene expression patterns in response to environmental changes is essential for viability. Yeast is continuously exposed to rapid and drastic changes in their external milieu. In particular, *Saccharomyces cerevisiae* possesses a very flexible and complex programme of gene expression when exposed to a plethora of environmental insults. Cells maintain their homeostasis through a highly coordinated mechanism of transcription regulation involving several factors, each performing specific functions. The basic region leucine zipper (bZip) proteins form one of the largest families of transcription factors in eukaryotic cells. *S. cerevisiae* contains a family of eight bZip proteins, designated by proteins Yap that modulates the regulation of specific genes involved in the response to stress such as oxidative, osmotic, arsenic, drug and heat stress, among others. The existing data on the Yap family members support both a degree of functional overlap between them as well as distinct physiological roles. Furthermore, data are beginning to emerge on the cross-talk between several members of this family. The double mutant *yap1yap2* is more sensitive to cadmium as well as the double mutant *yap1yap8* to metalloid than either single mutant, respectively.

For this, the main challenge of the present study was the construction of a strain deleted in several Yaps in well-defined background that may prove an invaluable tool for the functional study of each family member. This work based in the optimization and combination a set of techniques and steps, such as PCR-based methods for gene disruption, *Cre/loxP* system, tetrad analysis, in order to disrupt the several genes Yap and to assess by phenotypic tests the viability of different mutants.

Índice

RESUMO	vi	Análise das tetradas de levedura	32
ABSTRACT	vii	Parte III	
Abreviaturas	ix	Testes fenotípicos	33
		Parte IV	
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO		Purificação e análise de proteínas	33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo		Análise de células GFP por microscopia	
de estudo da resposta ao stress	3	de imuno fluorescência	36
Aspectos gerais da resposta ao stress			
na levedura <i>S. cerevisiae</i>	4	CAPÍTULO 4 - RESULTADOS	
Factores de Choque Térmico	5	E DISCUSSÃO	
Factores de transcrição Msn2 e Msn4	7	Obtenção dos mutantes	39
Família das Proteínas Yap	8	Análise fenotípica dos <i>YAPs</i>	50
Stress Oxidativo – Yap1	11	Yap1 e o stress com AsV	53
Stress a Metais Pesados – Yap2	15		
Stress Osmótico – Yap4/Yap6	16	CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO	
Stress ao Arsénio – Yap8/Yap1	18	Conclusão	57
Outros Membros da Família Yap	19	Perspectivas futuras	59
CAPÍTULO 2 - OBJECTIVOS		ANEXO	61
Objectivo	23		
		BIBLIOGRAFIA	69
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA			
Material e Métodos	28		
Parte I			
Geração da cassette de disrupção	28		
Transformação da <i>S. cerevisiae</i>	29		
Verificação da introdução correcta de			
kanMX4	30		
Remoção da cassette loxP-kanMX4-loxP	31		
Parte II			

ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

AP-1	Proteína activadora 1
ARE	Elemento de reconhecimento AP-1
bZip	domínio básico de ligação ao DNA (“basic region leucine zipper”)
cCRD	domínio C-terminal rico em cisteínas
Cd²⁺	Cádmio
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindole, diidrocloreto
DEM	Dietilmaleato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	2'-Deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-Deoxicitidina 5'-trifosfato
dTTP	2'-Deoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
GFP	Proteína de fluorescência verde
GPXs	Glutathione peroxidases
GRXs	Glutarredoxinas
GSH	Glutathione
G-418	Gentamicina
HOG	glicerol osmolaridade elevada
HSE	Elemento de choque térmico
HSF	Factor de choque térmico
Hsp	Proteína de choque térmico
KAN	Kanamicina
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
m/V	massa/Volume
MAP	Proteína activadora mitogénico
MAPKK	MAP cinase cinase
MDA	malondialdeído
NADP⁺	Resíduo dinucleótido adenina nicotinamida (forma oxidada)
NADPH	Resíduo dinucleótido adenina nicotinamida (forma reduzida)
nCRD	domínio N-terminal rico em cisteínas
NEM	N-etilmaleimida
NES	sinal de exportação nuclear (“nuclear export signal”)
NLS	sinal de localização nuclear (“nuclear localization signal”)
nm	nanómetros
O.D. 600nm	densidade óptica a 600 nanómetros
°C	graus Celsius
ORF	Grelha de leitura em fase aberta (“Open reading frame”)
pb	Pares de bases
PBS	Sal de fosfato tamponizado
PCR	Reacção da Polimerase em cadeia (“polymerase chain reaction”)
PEG	Polietilenoglicol
PSA	Persulfato de amónia
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	espécies de oxigénio reactivas
rpm	rotações por minuto
SC	meio completo sintético
SDS	Sulfato dodecil sódio
SDS-PAGE	SDS-electroforese gel poliacrilamida
STRE	Elemento de resposta ao stress

TCA	Ácido triclorídrico
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-tetrametilenodiamida
TRX	Tiorredoxina
v/v	volume/volume
wt	“wild type” (estirpe selvagem)
YPD	glucose-peptona-extracto de levedura
YRE	Elemento de reconhecimento yap

SÍMBOLOS DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS

Ala	alanina	Met	metionina
Asn	asparagina	Asn	asparagina
Cys	cisteína	Pro	prolina
Asp	ácido aspártico	Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico	Arg	arginina
Phe	fenilalanina	Ser	serina
Gly	glicina	Thr	treonina
His	histidina	Val	valina
Ile	isoleucina	Trp	triptofano
Lys	lisina	Tyr	tirosina
Leu	leucina	Glx	glutamato

SÍMBOLOS DAS BASES DE NUCLEÓTIDOS

A	adenina
C	citossina
G	guanina
T	timina

LEGENDA:

YAP – gene

yap – gene *YAP* disrompido

Yap – proteína

$\Delta 1$ – gene *YAP1* disrompido

Capítulo

1

INTRODUÇÃO

***Saccharomyces cerevisiae*, MODELO DE ESTUDO DA RESPOSTA AO STRESS**

Na natureza a manutenção da homeostase é um desafio constante para todos os organismos, continuamente submetidos a variações rápidas e drásticas do meio ambiente que podem alterar as funções celulares e impedir o crescimento da célula [1]. A capacidade de adaptação, destes organismos, às condições ambientais é um pré-requisito universal para a sua sobrevivência e evolução [3].

O estudo de respostas ao stress é crucial para a compreensão de como organismos unicelulares e multicelulares se adaptam a diversas mudanças do meio ambiente. Tais respostas requerem um sistema complexo de reconhecimento e transdução de sinal, permitindo o crescimento e proliferação da célula bem como a expressão de genes, actividades metabólicas e outras características da célula.

As leveduras, em particular *S. cerevisiae*, vulgarmente conhecida por levedura do pão (“baker yeast”) é considerada o organismo modelo no estudo dos mecanismos de resposta ao stress. Como eucarionte, apresenta uma organização intracelular complexa que consequentemente leva a mecanismos complexos de regulação da expressão genética tal como nos organismos multicelulares. A utilização das leveduras como modelo experimental apresenta inúmeras vantagens, genética, bioquímica e fisiologicamente. A *S. cerevisiae* é de fácil manipulação, tem um tempo de geração curto e a sua genética muito conhecida implica que a construção de mutantes definidos seja relativamente simples.

S. cerevisiae, tem desenvolvido mecanismos de resposta a uma variedade de condições de stress e na maioria dos casos estes mecanismos envolvem alterações na expressão de determinados genes [4, 5]. A existência destes mecanismos moleculares de resposta ao stress, muitos dos quais altamente conservados ao longo da natureza, fornecem à célula a flexibilidade requerida para se adaptar às diversas variações do meio ambiente [3]. Por exemplo, na resposta à carência de glucose, receptores localizados na membrana celular são activados induzindo uma via de transdução de sinal que envolve modificações no padrão de localização, fosforilação e actividade de proteínas específicas. Isto dá origem à degradação de determinadas proteínas e acumulação de outras “protectoras de stress” [1]. Deste modo, o aspecto mais importante da resposta celular ao stress consiste na reorganização da expressão genética através de mecanismos

de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução com o objectivo de diminuir a expressão de genes constitutivos e promover a expressão dos genes que codificam proteínas de stress [3].

O facto de *S. cerevisiae* ter o seu genoma completamente sequenciado permite a identificação rápida de genes envolvidos na resposta ao stress com uma função específica, bem como a identificação de ortólogos noutros organismos.

Todas estas características fazem da levedura *S. cerevisiae* um excelente modelo experimental para o estudo da resposta ao stress. Além disso, o seu estudo permite a compreensão de determinados mecanismos moleculares utilizados pelos mamíferos na regulação de diversos tipos de stress, tais como o stress oxidativo, que pode estar associado a doenças neurodegenerativas, má circulação sanguínea, cancro, anemia, desenvolvimento anormal dos ossos e do sistema nervoso e respostas imunes deficientes.

ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA AO STRESS EM *S. cerevisiae*

Quando uma célula ou organismo é sujeito a modificações do meio ambiente impostas por factores naturais ou artificiais tendo como consequência a indução de proteínas específicas, as chaperones moleculares, diz-se que se trata de uma resposta ao stress. Estas proteínas de variadas massas moleculares oferecem à célula mecanismos de protecção tais como a degradação de proteínas mal formadas que apresentam propriedades tóxicas. Concomitantemente, a síntese proteica constitutiva é reprimida através de vários mecanismos, em particular ao nível da iniciação desta síntese e/ou ao nível da estabilidade dos mRNAs.

A síntese de chaperones moleculares e outras proteínas em resposta às várias formas de stress, que vão desde o stress osmótico, térmico, oxidativo, metalóide, entre outros, envolve vários factores de transcrição, tais como os factores de choque térmico (HSF), Msn2/Msn4, e os factores de transcrição AP-1 da levedura, os Yap's.

FACTORES DE CHOQUE TÉRMICO

As proteínas de choque térmico (Hsps) foram inicialmente descobertas como um conjunto de proteínas induzidas pelo choque térmico e outros stresses químicos e físicos incluindo a falta de nutrientes, radiação solar, concentrações elevadas de peróxidos e derivados, iões metálicos (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}), etanol, cloreto de sódio, várias drogas e compostos tóxicos, como os fungicidas (fluconazole, benomil) e outros [6].

As Hsps estão classificadas em diferentes famílias com base na sua massa molecular e na sua indução a diversos estímulos. São denominadas como chaperones moleculares, as quais têm em comum a propriedade de modificarem a estrutura de outras proteínas e a interacção com os respectivos substratos (Tabela 1) [7]. As Hsps são particularmente necessárias na manutenção da estrutura correcta das proteínas danificadas através do choque térmico e stress oxidativo [6, 8].

Tabela 1: Exemplos de genes da família das proteínas de choque térmico (Hsps), (adaptado de [9]).

Nº	NOME GENE E IDENTIFICAÇÃO	NOME COMUM	REFERÊNCIAS
1	Ubiquitina	Ubiquitina	Baker and Board (1987)
2	HSP 10	<i>Hsp10</i> , <i>Chaperonina 10</i> , <i>Cpn1</i>	Chen et al (1994)
3	HSP 27-2	<i>HspB2</i> , <i>MKBP</i>	Iwaki et al (1997)
4	HSP 27-3	<i>HspB3</i> , <i>HspL27</i>	Lam et al (1996)
5	HSP 27	<i>Hsp27</i> , <i>HspB1</i>	Carper et al (1990)
6	α B-cristalina	Alfa B-cristalina	Iwaki et al (1993)
7	HSP 40-1	<i>Hsp40</i> , <i>HspF1</i>	Hata et al (1996)
8	HSP 40-like	<i>DnaJ-like Hsp40</i> , <i>HLJ1</i>	Hoe et al (1998)
9	HSP 47	<i>Hsp47</i> , <i>Colagina 2</i> , <i>Clp2</i>	Ikegawa et al (1995)
10	HSP 60-1	<i>Hsp60</i> , <i>Chaperonina 60</i>	Jindal et al (1989)
11	HSP 70-1A	<i>Hsp70-1a</i>	Hunt and Morimoto (1985)
12	HSP 70-like1	<i>Hsp70-like 1</i> , <i>HspA1L</i>	Milner and Campbell (1990)
13	HSP 70-1B	<i>Hsp70-1B</i> , <i>HspA-1B</i>	Milner and Campbell (1990)
14	HSP 70-2	<i>Hsp70-2</i> , <i>HspA2</i>	Bonnycastle et al (1994)
15	HSP 70-4	<i>Hsp70RY</i> , <i>HspA4</i> , <i>agp-2</i>	Fathallah et al (1993)
16	HSP 70-5	<i>Grp78</i> , <i>Bip</i>	Ting and Lee (1988)
17	HSP 70-6	<i>Hsp70B</i>	Leung et al (1990)
18	HSP 70-8	<i>Hsp70-8</i>	
19	HSP 70-9B	<i>Gpr75</i> , <i>mtHsp75</i> , <i>Mortalina-2</i>	Bhattacharyya et al (1995) and Domanico et al (1993)
20	HSP 75	<i>TRAP1</i>	Song et al (1995)
21	HSP, DNAJ-like 1	<i>Hdj-1</i>	
22	HSP, DNAJ-like 2	<i>Hdj-2</i>	Chellaiah et al (1993)
23	“Enhancer protein in HSP 70”	<i>PPF1A4</i> , <i>LAR-IP1b</i>	Ariga (1995)
24	HSP 90-1 α	<i>Hsp90 α</i>	Yamazaki et al (1989)
25	HSP 90-1 β	<i>Hsp90 β</i>	Rebbe et al (1989)
26	HSP 105	<i>Hsp 105 α</i>	Negase et al (1996)

A transcrição de um gene Hsp é regulada pelos factores de transcrição da família do Factor de Choque Térmico (HSF), que assegura a activação da sua transcrição numa condição de stress e subsequente inactivação após a recuperação [10]. Deste modo, os HSFs desempenham um papel central no mecanismo do controlo homeostático.

Os HSFs são proteínas que contêm um domínio de ligação ao DNA “helix-turn-helix”, um domínio “leucine zipper” essencial para a estabilidade e regulação da formação de homotrímeros e um domínio de *trans*-activação carboxil-terminal [5, 11, 12]. A indução da transcrição de genes de choque térmico nos eucariontes é regulada pela ligação do activador transcripcional, HSF, a uma sequência de DNA de 5 pb do elemento de choque térmico (HSE), nGAAn, presente na região promotora dos genes de choque térmico. Consequentemente, são induzidas as proteínas de choque térmico (HSPs), as quais também são estimuladas por outros factores ambientais. Muitas destas proteínas de stress actuam como chaperones moleculares, as quais desempenham um papel chave na recuperação da célula através da renaturação de proteínas danificadas protegendo-as da degradação irreparável [5, 13]. Além disso, as proteínas de choque térmico estão presentes em todos os organismos em condições fisiológicas, desempenhando um papel vital no funcionamento normal da célula, como o crescimento relacionado com a divisão celular, síntese de DNA, transcrição e tradução [14].

FACTORES DE TRANSCRIÇÃO Msn2 e Msn4

Em *S. cerevisiae* a regulação da expressão genética em condições de stress também ocorre por mecanismos independentes dos HSFs [15].

A transcrição de um variado número de genes induzidos por múltiplas condições de stress é, também, regulada pelo Elemento de Resposta ao Stress (STRE) através dos factores de transcrição Msn2 e Msn4. As duas proteínas Msn2 e Msn4 são funcionalmente semelhantes e desempenham um papel chave na regulação da expressão de genes de resposta ao stress em *S. cerevisiae*, [16-18].

Sob determinadas condições de stress (choque térmico, stress osmótico, stress induzido por falta de nutrientes e pela presença de etanol e sorbitol, etc), Msn2 e Msn4 acumulam-se no núcleo levando à activação transcripcional dos genes específicos via elementos de resposta ao stress (STRE; CCCCT). A localização nuclear de Msn2 e Msn4 está inversamente relacionada, ou seja, é regulada negativamente pelos níveis de cAMP e pela actividade da proteína cinase A (PKA) [15]. A actividade da PKA é essencial para o crescimento da levedura e antagoniza a indução de uma resposta ao stress bem como a acumulação de reservas de glicogénio, desempenhando um papel central na coordenação do crescimento e do metabolismo da célula na resposta ao stress [19]. Isto sugere que o stress e a localização intracelular do Msn2 e Msn4 regulada pela PKA são o passo chave no processo de transcrição dependente de STRE na resposta ao stress [15].

Por vezes Msn2 e Msn4 são considerados factores de transcrição redundantes, contudo estas proteínas apresentam pequenas diferenças de comportamento na célula. A disrupção do *MSN2*, por exemplo, resulta na diminuição da expressão dos vários genes regulados por STRE em resposta ao stress, enquanto que a disrupção do *MSN4*, por vezes, não tem qualquer efeito neste tipo de expressão [18, 20]. Por outro lado, na ausência de *MSN2*, Msn4 contribui claramente para a indução transcripcional de alguns genes [20]. Isto indica que Msn2 e Msn4 podem ter funções diferentes na célula.

FAMÍLIA Yap (“Yeast Activator Protein”) – FACTORES DE TRANSCRIÇÃO AP-1 DE *S. cerevisiae*

As proteínas bZip (“basic region leucine zipper”) formam uma das maiores famílias de factores de transcrição nas células eucariontes [21]. O domínio “leucine zipper” é uma estrutura formada por duas hélices α que contém leucinas de ambos os lados ao longo de cada hélice que permitem a dimerização e formação de uma interface simétrica que se liga aos dois lados da dupla hélice do DNA (Figura 1). Os dímeros têm capacidade de se ligar a pequenas sequências alvo palindrómicas ou pseudo-palindrómicas.

Os factores de transcrição AP-1 consistem em homodímeros e heterodímeros das proteínas bZip que pertencem às subfamílias Jun (c-Jun, v-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, v-Fos, FosB, Fra1, Fra2) e outras. TGACTCA é a sequência consenso AP-1 reconhecida por estas proteínas bZip.

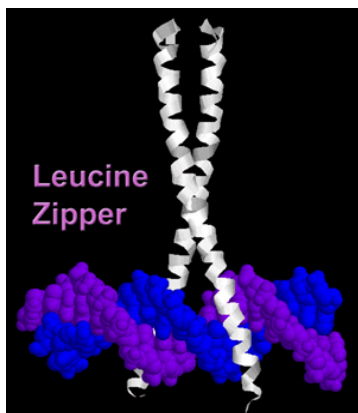


Figura 1: Ilustração do domínio “leucine zipper”
([www.wiley.com/.../ protein_dna/leu_zipper.gif](http://www.wiley.com/.../protein_dna/leu_zipper.gif))

Desde as leveduras aos humanos, todos os organismos eucariontes contém factores de transcrição AP-1, que estimulam a expressão de genes específicos na resposta a uma variedade de estímulos extracelulares [22-24].

Em *S. cerevisiae*, o factor de transcrição AP-1 melhor caracterizado é o Gcn4, o qual coordenadamente activa a transcrição de pelo menos 40 genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos essenciais. Em termos funcionais o Gcn4 é semelhante às oncoproteínas Jun e Fos.

De entre as catorze proteínas bZip que a *S. cerevisiae* contem, oito são os Yap's (Yap1 – Yap8), que formam a família Yap [22].

A sequenciação dos genes *YAP* revelou a presença do domínio bZip no N-terminal homólogo ao Gcn4, apresentando também duas regiões semelhantes, uma no C-terminal e outra na região interna localizada próximo do domínio bZip (Figura 2) [25].

REGIÃO BÁSICA								LEUCINE ZIPPER																																										
QKRTA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	R	E	R	K	E	R	K	M	K	E	L	E	K	K	V	Q	S	L	E	S	I	Q	Q	N	E	A	T	F	L	R	D	Q	L	I	T	L	Yap1	(68-120)					
SRRTA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	R	D	R	K	E	A	K	M	K	S	L	Q	E	R	V	E	L	L	E	Q	K	D	A	Q	N	K	T	T	T	D	F	L	L	C	S	L	K	S	L	Yap2	(47-99)		
AKKKA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	R	E	R	K	E	A	R	M	K	E	L	Q	D	K	L	L	E	S	E	R	N	Q	S	L	L	K	E	I	E	E	L	R	K	A	N	T	E	I	Yap3	(148-200)			
TKRAA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	Q	R	R	E	K	Y	I	K	N	L	E	E	K	S	K	L	F	D	G	L	M	K	E	N	S	E	L	K	K	M	I	E	S	L	K	S	K	L	Yap4	(241-293)			
QKKKR	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	A	Y	R	E	R	K	N	N	K	L	Q	V	L	E	E	T	I	E	S	L	S	K	V	V	K	N	Y	E	T	K	L	N	R	L	Q	N	E	L	Q	A	K	Yap5	(62-114)
TRRAA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	A	Q	R	K	E	K	Y	I	K	N	L	E	Q	S	K	I	F	D	D	L	A	E	N	N	N	F	K	S	L	N	D	S	L	R	N	D	N	Yap6	(225-277)				
EKRRR	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	A	Y	R	E	R	T	T	R	I	Q	V	L	E	E	K	V	E	M	L	H	N	L	V	D	D	W	Q	R	K	Y	K	L	E	S	E	F	S	D	T	Yap7	(129-181)		
NKRAA	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	A	F	R	K	R	K	L	E	R	L	E	E	L	E	K	K	E	A	Q	L	T	V	T	N	D	Q	I	H	I	L	K	K	E	N	E	L	L	H	F	M	L	Yap8	(20-72)
SKRKA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	F	R	K	R	K	E	D	H	L	K	A	E	T	Q	V	V	T	L	K	E	L	H	S	S	T	T	L	E	N	D	Q	L	R	Q	K	V	R	Q	L	Pap1	(120-172)		
SKRTA	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	Y	R	E	R	K	E	R	K	M	K	E	L	D	K	V	R	L	L	E	D	A	N	V	R	A	L	T	E	T	D	F	L	R	A	Q	V	D	V	L	Cap1	(44-96)		
ALKRAR	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	R	A	R	K	L	Q	R	M	K	Q	L	E	D	K	V	E	E	L	L	S	K	N	Y	H	L	E	N	E	V	A	R	L	K	K	L	V	G	E	R	Gcn4	(229-281)		
	*	*	*								*					*				*				*				*				*																		
	235	238	242								253					260							267								274																			
			239	243																																														

Figura 2: Comparação dos domínios bZip dos Yaps. Sequência dos domínios bZip dos oito membros YAP da *S. cerevisiae* comparada com as regiões correspondentes do Gcn4 e proteínas semelhantes aos Yap's na *S. pombe* (Pap1) e na *C. albicans* (Cap1). Na região básica, os resíduos que interagem directamente com o pares de bases estão a **vermelho** e os resíduos específicos dos YAPs estão a **azul e sublinhado**. Na região “leucine zipper”, os resíduos de leucina conservados e outros na posição **d** da estrutura “coiled coil” estão a **negrito** e os resíduos hidrofóbicos na posição **a** da estrutura “coiled coil” estão **sublinhados** [22].

As características que distinguem a família Yap da proteína Gcn4p são os aminoácidos que contactam com o DNA [5, 22]. No caso do Gcn4, o domínio básico contem 5 resíduos de aminoácidos (Asn235, Ala238, Ala239, Ser242 e Arg243) responsáveis pelo contacto específico com o DNA (Figura 2). No caso dos Yap's na posição 238 a alanina foi substituída por uma glutamina e na posição 242 uma fenilalanina/tirosina substitui uma serina. Além disso, as posições

234 e 241 que correspondem a uma glutamina e alanina respectivamente são específicas da família Yap (Figura2). O domínio de ligação da família Yap foi caracterizado como TTAC/GTAA para as proteínas Yap1-Yap4, o qual difere do Gcn4 (TGAG/CTCA) [5] . Até agora não foi estabelecida a especificidade de ligação ao DNA para as proteínas Yap5-Yap8, no entanto resultados recentes obtidos no nosso laboratório sugerem que o Yap8 se liga à sequência TTAATAA [27]. Ortólogos do Yap1 foram descritos noutros organismos como a *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1) [28], *Candida albicans* (Cap1) [29] e *K. lactis* (KlYap1) [30].

Aproximadamente 15% do genoma contem uma ou mais sequências consenso de elemento de resposta Yap (YRE) bem posicionadas na sua região promotora (200 – 500pb), destacando-se assim o potencial efeito regulador desta família de factores de transcrição [5].

No que diz respeito às semelhanças estruturais entre os membros da família Yap, o Yap1 apresenta uma grande homologia com o Yap2, o Yap4 com o Yap6 e o Yap5 com o Yap7, enquanto que o Yap8 é o menos relacionado com os membros da família.

Vários estudos têm demonstrado que a família Yap está envolvida numa série de respostas ao stress incluindo o stress oxidativo, osmótico, arsénico, térmico a uma variedade de drogas, entre outros.

STRESS OXIDATIVO – Yap1

Como consequência de um crescimento aeróbio, as células estão continuamente expostas a espécies reactivas de oxigénio (ROS), as quais resultam de uma redução incompleta do O₂ durante a respiração, assim como da exposição a vários agentes químicos e metais. Estas espécies reactivas são oxidantes potentes que causam danos a nível do DNA, proteínas e conteúdo lipídico das células (Figura 3) [3, 5, 31-33]. Os danos oxidativos podem ocorrer a vários níveis:

- nos ácidos nucleicos devido às reacções de Fenton e Haber-Weiss resultando numa quebra da cadeia de DNA;
- peroxidação lipídica resultando em danos nas membranas e formação de produtos tóxicos como malonodialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) os quais podem reagir com outros componentes celulares;
- oxidação de proteínas;
- inactivação de enzimas devido a reacções do anião superóxido com o complexo 4Fe-4S resultando na desorganização destes e na libertação de ferro o qual pode participar noutras reacções de Fenton e Haber-Weiss; e
- na actividade da mitocondria, uma outra fonte de ROS devido à redução incompleta de O₂ [34].

O factor de transcrição Yap1 é o regulador central da resposta ao stress oxidativo em *S. cerevisiae* [33]. O Yap1 foi inicialmente identificado com base na capacidade de se ligar à sequência 5'-TGACTAA do elemento *cis* AP-1 presente na região promotora do “simian virus 40” e subsequentemente purificada como uma proteína de 90 kDa [5, 35]. Recentemente foi demonstrado que o Yap1 se liga preferencialmente à sequência palindrómica 5'-TTAC/GTAA-3' [35].

O papel do Yap1 foi caracterizado através da observação de que o mutante *yap1* é sensível aos oxidantes H₂O₂ e t-BOOH, aos químicos geradores de aniões superóxido (menadiona, plumbagina e metilviologeno), bem como ao cádmio, metilglioxal e ciclohexamida [3]. Em seguida verificou-se que os mutantes *yap1* tinham uma redução na actividade específica de várias enzimas envolvidas na destoxificação do oxigénio, tais como a superóxido dismutase, desidrogenase glucose-6-fosfato e glutathione reductase [36].

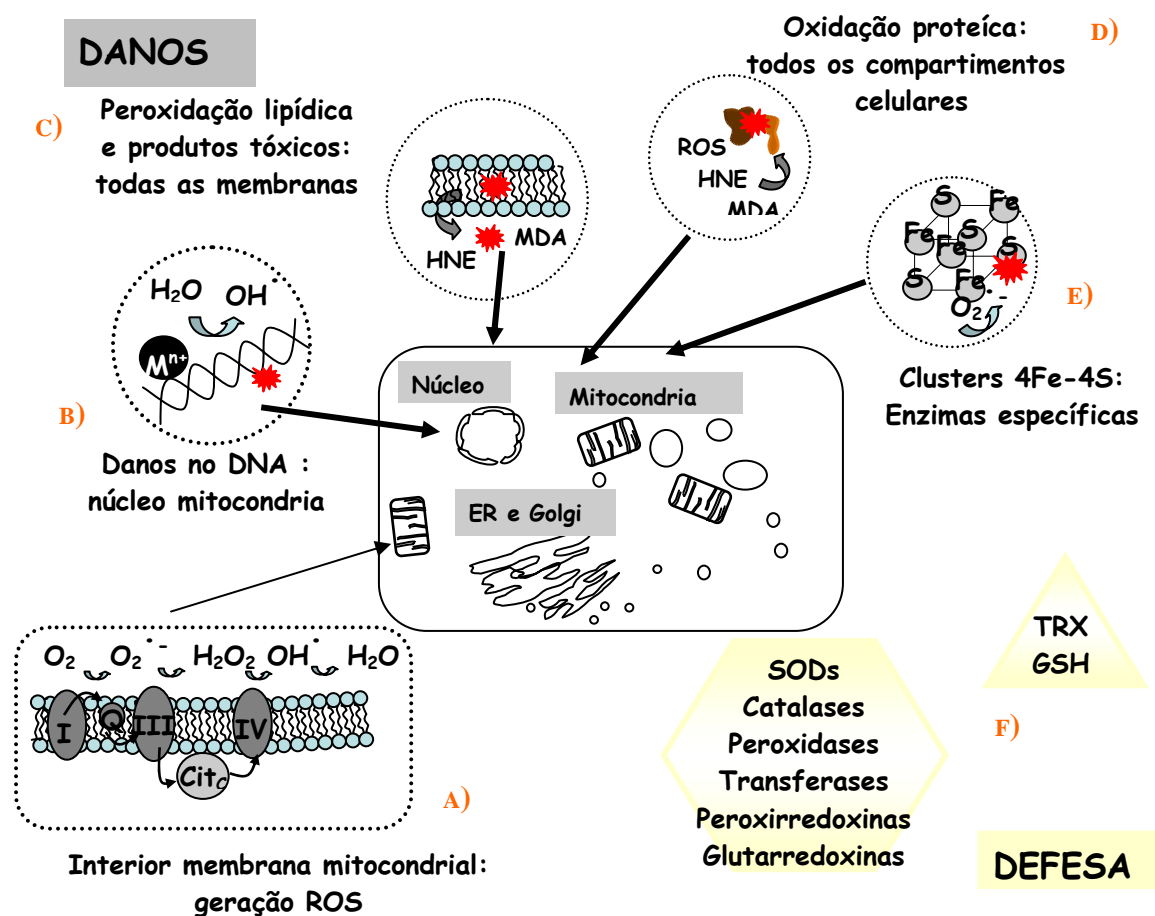


Figura 3: Representação esquemática das vias de stress oxidativo e respectivas defesas na célula eucarionte: **A)** danos na actividade da mitocôndria; **B)** nos ácidos nucleicos; **C)** peroxidação lipídica; **D)** oxidação de proteínas; **E)** inativação de enzimas; **F)** vias TRX e GSH essenciais na defesa da célula (adaptado de [34] com modificações).

Kuge *et al.* [37], elucidou o papel do Yap1 no mecanismo de resposta ao stress oxidativo através da identificação de *TRX2* como um dos seus genes alvo, demonstrando que a indução deste gene por H_2O_2 , t-BOOH e diamida é dependente do Yap1. A identificação do segundo gene alvo do Yap1, *GSH1* aconteceu na descoberta do mecanismo de destoxificação do cádmio [38]. Desde então, vários genes alvos do Yap1 relacionados com a destoxificação de ROS têm vindo a ser identificados, incluindo aqueles que estão envolvidos com a tioredoxina, glutatona, e outros antioxidantes, tais como as catalases e a superóxido dismutase, entre outros [3, 5].

O mecanismo de regulação do Yap1 foi descrito por Kuge *et al.* [37], que demonstrou que este é importado e exportado do núcleo através da interacção com uma exportina nuclear

denominada Crm1 (Xpo1), com o sinal de exportação nuclear (NES), que consiste num domínio N-terminal (n-CDR) e num domínio C-terminal (c-CDR), ambos ricos em cisteínas [39, 40].

Nas células expostas ao stress por H_2O_2 , duas cisteínas do Yap1, Cys303 do domínio n-CDR e Cys598 do domínio c-CDR, são oxidadas, formando-se uma ponte de dissulfureto que “esconde” o NES, impedindo assim a ligação com a exportina Crm1 [41]. O Yap1 fica acumulado e redistribuído pelo núcleo onde regula a expressão de mais de 70 genes (Figura 4). Esta oxidação do Yap1 é mediada por uma tiol peroxidase, Orp1 (Hyr1/Gpx3), que é o principal sinal detector do stress oxidativo (Figura 5). A Orp1 possui um resíduo de cisteína conservado (Cys36) que é directamente oxidado pelo H_2O_2 havendo libertação de H_2O e ácido sulfénico Cys36-OH, que por sua vez oxida a Cys598 do Yap1 formando-se um ligação de dissulfureto entre Orp1-Yap1. Esta ligação inter-molecular é então transposta para uma ligação dissulfureto intra-molecular Cys303-Cys598 do Yap1 [42].

Recentemente, Veal *et al.*, [43] descreveu a proteína Ybp1 como um novo regulador de ROS. Ybp1, sob stress com H_2O_2 , regula a indução da expressão de *TRX2*, um gene dependente do Yap1. Tal sugere que o Ybp1 é essencial para a activação do Yap1 pelo H_2O_2 (Figura 5). Sob a condição de stress com H_2O_2 , Ybp1 forma um complexo com Yap1 estimulando a oxidação induzida pelo peróxido, a acumulação nuclear e a actividade deste factor.

A resposta ao stress oxidativo induzido pela diamida, *N*-etilmaleimida (NEM), quinona ou menadiona não requer a função da peroxidase Orp1, bem como não envolve a Cys303 localizada no domínio n-CDR [37, 41]. As cisteínas do domínio c-CDR sofrem modificação devido á ligação directa do agente de stress ao Yap1, sendo o suficiente para a sua deslocação para o interior do núcleo.

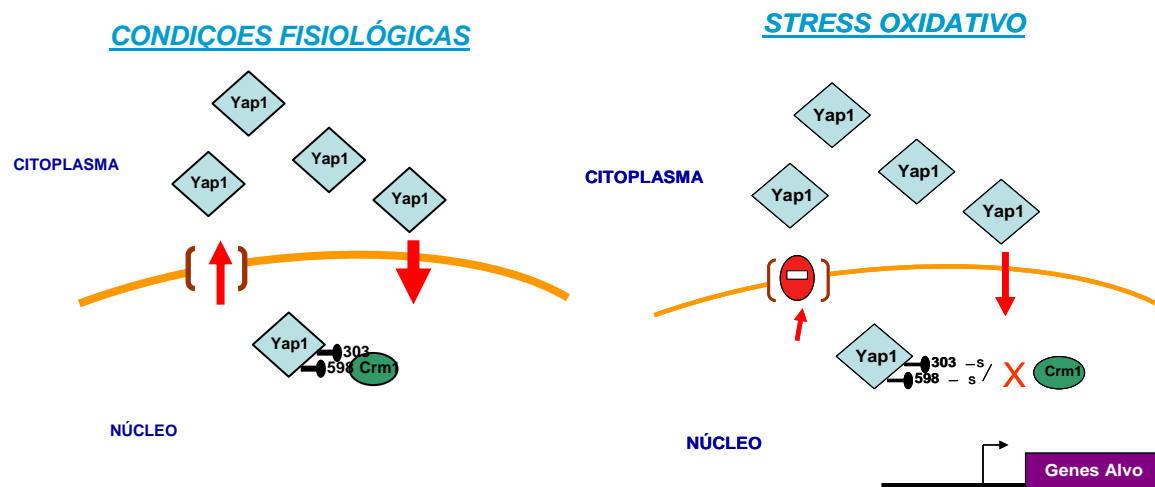


Figura 4: Representação esquemática da distribuição sub-celular do Yap1 em condições fisiológicas e sob stress, respectivamente

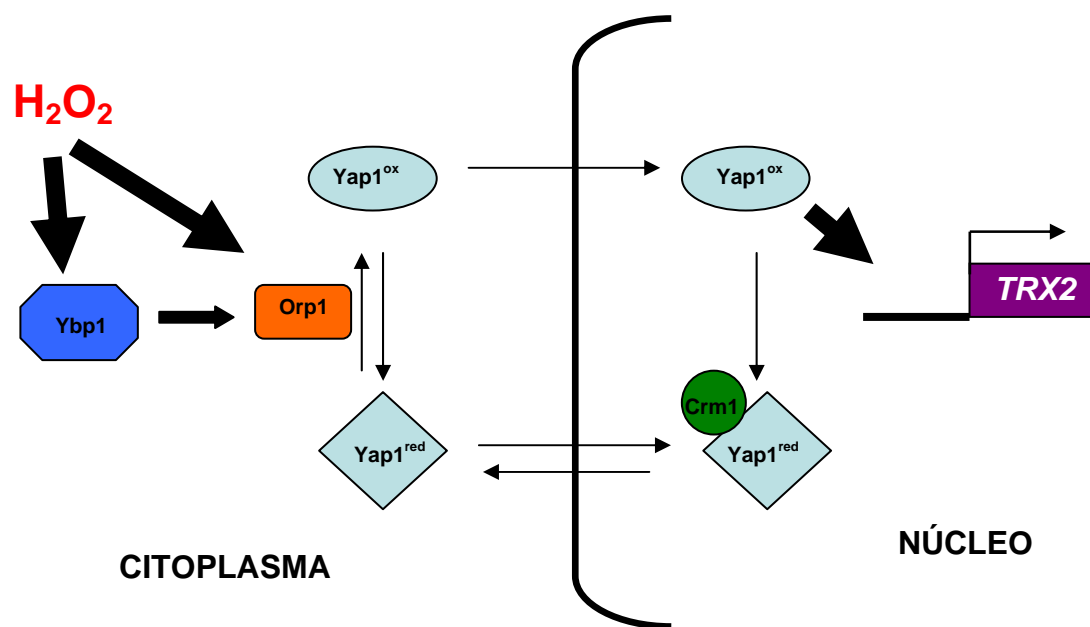


Figura 5: Modelo de regulação do Yap1 pelo Ybp1. Sob condições fisiológicas o Yap1 que está na forma reduzida (Yap1^{red}) é importado e exportado do núcleo via Crm1. Sob tratamento com H_2O_2 o Yap1 é oxidado (Yap1^{ox}) por acção da Orp1/Gpx3. Yap1^{ox} não interage com Crm1 e acumula-se no núcleo, onde é activada a transcrição dos genes induzidos por H_2O_2 , tal como o TRX2. Ybp1, embora dependente de Orp1/Gpx3, é importante na resposta ao H_2O_2 estimulando a acumulação nuclear do Yap1 e a transcrição de TRX2 ([43], com modificações).

STRESS A METAIS PESADOS – Yap2

Os metais pesados como o cobre, zinco, ferro e magnésio desempenham um papel importante na fisiologia e na bioquímica celular. Contudo a elevada concentração destes metais no meio ambiente implica toxicidade para os organismos, representando um dos maiores riscos para a saúde humana [44]. Por outro lado, o cádmio (Cd^{2+}) e o mercúrio (Hg^{2+}), são metais não essenciais que mesmo em concentrações baixas causam danos severos [3]. O Cd^{2+} , por exemplo, exerce toxicidade através da sua incorporação inespecífica na estrutura de proteínas essenciais causando a inactivação destas [45].

Análises do transcriptoma indicam que o Yap2 regula um conjunto de proteínas envolvidas na estabilização e no rearranjo de proteínas específicas num ambiente oxidativo [47].

A super-expressão do Yap2 confere resistência a agentes de stress, tais como o cádmio [38], cerulina [46] e 1,10-fenantrolina [25], entre outros, sugerindo um papel na resposta ao stress provocado por estas drogas.

O mecanismo de activação para o Yap2 é muito semelhante ao descrito para o Yap1. Sob exposição ao stress causado pelo cádmio o Yap2 é acumulado no núcleo via Crm1, onde activa a transcrição do gene *FRM2*. Fmr2 é uma proteína homóloga à nitroreductase e o seu papel na destoxificação do Cd^{2+} e de outros metais pesados é ainda pouco clara [25].

A grande homologia das sequências presentes no domínio c-CRD do Yap1 e do Yap2 (Yap1 570-650 e Yap2 330-409) permitiu alguns avanços na compreensão da função do Yap2. A substituição do c-CRD do Yap1 pelo do Yap2 demonstra que a fusão proteica é regulada pelo cádmio e não pelo H_2O_2 (D Azevedo & C Rodrigues-Pousada, dados não publicados). A localização nuclear da fusão proteica está relacionada não apenas com a activação da transcrição do *FRM2*, mas também com o crescimento da levedura em concentrações elevadas de cádmio, o que indica, portanto, que a especificidade para a resposta ao stress induzido por H_2O_2 e pelo cádmio reside no domínio carboxil terminal do Yap1 e Yap2 respectivamente [3].

Dado que os fenótipos de sobre-expressão não reflectem necessariamente a verdadeira função biológica e nem o fenótipo está realmente associado ao mutante *yap2*, o papel preciso desta proteína ainda não está claro.

STRESS OSMÓTICO – Yap4/Yap6

O stress hiper-osmótico consiste no fluxo passivo de água da célula para o exterior, resultando numa diminuição do volume celular, na perda da pressão da turgescência celular e num aumento da concentração dos solutos no citoplasma. O stress hipo-osmótico consiste no movimento da água para dentro da célula, levando ao inchaço celular, elevada pressão da turgescência e diluição do meio intracelular.

Sob exposição de uma osmolaridade externa elevada, as leveduras imediatamente diminuem o seu crescimento e desencadeiam respostas específicas com vista a induzir a sua adaptação às novas condições do meio [48]. A resposta ao stress hiper-osmótico implica a transcrição de genes específicos relacionados com o aumento do metabolismo do glicerol [49, 50], entre outros, uma vez que para neutralizar os seus efeitos a célula usa o glicerol e a trealose, que a protegem regulando a pressão osmótica intracelular [41, 51].

A biossíntese do glicerol é induzida através da activação da via HOG MAP cinase [5]. Esta via é activada através da mobilização dos receptores membranares, Sho1 e Sln1 que constituem duas vias independentes da MAP cinase cinase (MAPKK) Pbs2. Após fosforilação pela Pbs2 a cinase Hog1 é activada acumulando-se rapidamente no núcleo [52]. A presença de Hog1 no núcleo é regulada pelas tirosina fosfatases Ptp2 e Ptp3 [43], pelas fosfoserina/treonina fosfatases Ptc1-3 e por vários factores de transcrição que interagem com Msn2/4 [53], Hot1 e Msn1 [42], os quais regulam a expressão global dos genes *YAP4* e *YAP6* [54].

Sob stress hiperosmótico, a indução do Yap4 é regulada pelo Msn2 via STRE presentes na sua região promotora (Figura 6) [48]. A super-expressão do Yap4 confere tolerância ao sal [55] bem como resistência a drogas antimalariais [56] e cisplatina [57].

Dados recentes obtidos no nosso laboratório, (Nevitt, Pereira e Rodrigues-Pousada), indicam que o Yap6 também é induzido na resposta a vários tipos de stress inclusive ao stress osmótico. O Yap4 e o Yap6 estão constitutivamente localizados no núcleo e são os dois membros da família Yap que apresentam maior similaridade, cerca de 33%. Embora a função exacta do Yap4 ainda permaneça pouco clara, a análise de resultados obtidos por “microarrays” revelaram que o este contribui para a regulação de vários genes osmoinduzidos, tais como os genes envolvidos no metabolismo do glicerol. Em mutantes *yap4* a expressão do gene *GCY1*, o qual codifica a glicerol desidrogenase e do *GPP2*, o qual codifica a fosfato-3-glicerol fosfatase

dependente de NAD está reduzida (Figura 6) [48]. Por outro lado, o gene *HXT5*, que codifica um transportador de hexose também parece ser parcialmente regulado pelo Yap4 e apresenta uma diminuição de expressão ainda maior no duplo mutante *yap4yap6*, sugerindo a existência de algum tipo de cooperação entre estes dois factores de transcrição na resposta ao stress osmótico [58].

A observação de que estes dois factores de transcrição são induzidos por uma variedade de stresses tem vindo a apontar para um papel fundamental ao nível da maquinaria transcripcional do Yap4 e Yap6 em resposta da levedura ao stress [3].

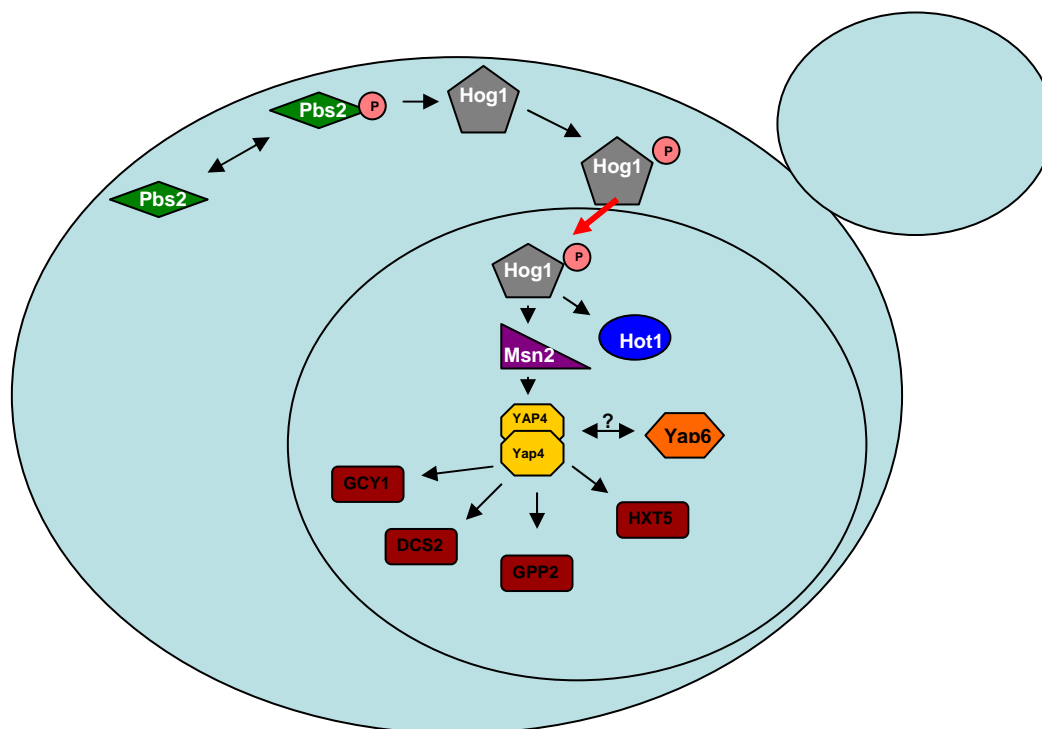


Figura 6: Yap4 como componente da via HOG. Em células submetidas ao stress osmótico, a acumulação de Hog1 no núcleo favorece a activação do Msn2 que por sua vez activa o Yap4 e os seus genes alvo ([3] com modificações).

STRESS AO ARSÊNIO – Yap8/Yap1

A distribuição ubíqua de metalóides na natureza, tem implicado que a maioria dos organismos vivos adquiram resistência a estes compostos [59, 60]. Em *S. cerevisiae* a resistência ao metalóide arsénio é conseguida através da activação de duas vias de destoxificação (Figura 7). A via ACR (Resistência aos Compostos de Arsénio), composta pelo regulador positivo Acr1 (Yap8), pela arsenato redutase Acr2 e pela proteína de membrana responsável pela extrusão do arsenito Acr3. Através de uma via paralela, os conjugados $\text{As}(\text{GS})_3$ são sequestrados para o vacúolo pela bomba vacuolar, Ycf1 (Factor do Cádmio na Levedura) [27, 61-63].

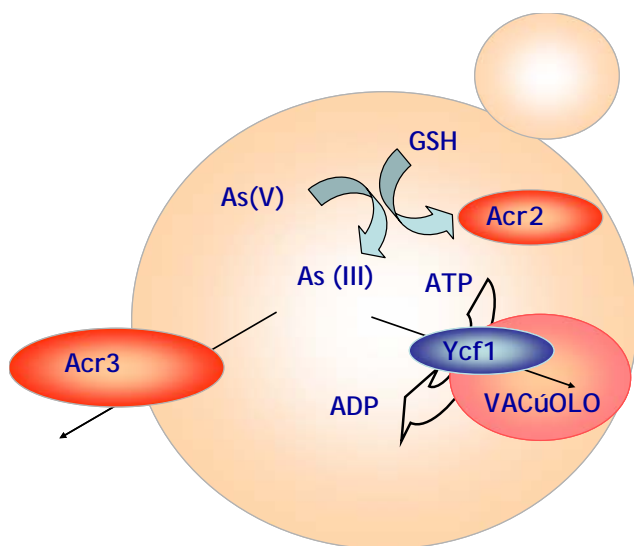


Figura 7: Vias de destoxificação dos compostos de arsénio na *S. cerevisiae*. Acr2 é uma enzima que se liga a Grx-GSH, reduzindo o As(V) a As(III) . O As(III) é expulso para fora da célula por Acr3 ou pode conjugar-se com GSH formando As(GS)_3 . Ycf1 remove o As(III) do citoplasma bombeando o As(GS)_3 para o interior do vacúolo (adaptado de [2]).

A indução da expressão dos genes *ACR2*, *ACR3* e *YCF1* pelo factor de transcrição Yap8 é essencial na resposta ao stress causado pelos compostos de arsénio.

Dados obtidos no nosso laboratório sugerem que, apesar do Yap8 ser o principal regulador da expressão destes três genes, o Yap1 também parece estar envolvido na sua regulação [64]. Tal como o Yap1, o Yap8 é constitutivamente expresso e sob condições de stress induzido pelo arsénio, é activado através de sua translocação para o núcleo e activação do seu potencial de transactivação. Assim como ocorre com o Yap1, a acumulação do Yap8 no núcleo é provocada

pela inibição da interacção com Crm1 [64], através da modificação dos resíduos de cisteína, Cys132, Cys137 e Cys274, que também são essenciais para a sua função de transactivação.

Estudos realizados por Haugen *et al* [65] revelaram a existência de diversos genes que têm a sua transcrição activada sob stress induzido por compostos de arsénio, de entre eles os genes envolvidos no metabolismo da metionina, na assimilação de enxofre, na regulação da transcrição e degradação de proteínas, e ainda outros genes que codificam proteínas que cooperam entre si numa resposta ao stress, tais como, Fhi1, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2, Hsf1 e Rpn4 entre outras. Além disso dados obtidos recentemente pela técnica de “microarrays” apontam para a existência de outros mecanismos de destoxificação dos compostos de arsénio mediados pelo Yap8 (C Amaral, F Devaux, R Menezes, C Facq & C Rodrigues-Pousada, dados ainda não publicados).

OUTROS MEMBROS DA FAMÍLIA Yap – Yap3, Yap5 e Yap7

De acordo com dados obtidos por “microarrays”, o Yap3 parece não estar envolvido na resposta aos vários tipos de stress celular. O Yap3 apresenta uma elevada homologia (34% de identidade e 45% de similaridade) com a proteína Fcr3 (proteína de resistência ao fluconazole 3) de *Candida Albicans* [66]. Yang *et al.* [66] sugerem, portanto, que o Fcr3 é um ortólogo do Yap3 podendo assim também estar envolvido na resistência a drogas em *S. cerevisiae*.

De acordo com [22] o Yap5 não se liga à sequência consenso TTACTAA dos *YAPs*. Dados obtidos por “microarrays” indicam que o Yap5 é fortemente induzido sob a carência de aminoácidos e nitrogénio e na fase estacionária [67]. No entanto, estes dados ainda não foram validados por Northern blot e PCR em tempo real.

No que diz respeito ao Yap7, dados obtidos por “microarrays”, indicam uma forte repressão em condições de carência de nitrogénio e na fase estacionária [5].

Capítulo

2

OBJECTIVOS

1. OBJECTIVO GERAL

Este trabalho teve como objectivo a obtenção de uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* com o menor número de factores de transcrição da família YAP, com vista a estudar o papel de cada um deles na resposta ao stress.

2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- I. Optimização da metodologia de disrupção de genes permitindo a criação de mutantes *S. cerevisiae* sem factores de transcrição *YAP* (*yap1-8*);
- II. Optimização do processo de esporulação e subsequente análise das tetradas dissecadas;
- III. Análise da viabilidade e sensibilidade dos vários mutantes a diversos tipos de stress;
- IV. Estudo do papel do Yap1 na resposta ao stress induzido pelo arsenato.

Capítulo

3

METODOLOGIA

DESCRIÇÃO DO TRABALHO REALIZADO

O trabalho desenvolvido divide-se em quatro partes:

- I. Disrupção dos genes YAP – geração de mutantes *yap1-8* através da recombinação homóloga entre uma cassette de kanamicina (kanMX4), previamente construída com o uso de primers adequados e o gene em estudo.
- II. Conjugação dos diferentes mutantes dando origem a várias estirpes diplóides (MATa/ α). Esporulação dos respectivos diplóides seguida da dissecação de tetradas confirmação pela técnica de PCR.
- III. Análise fenotípica dos vários mutantes obtidos com vista ao estudo da sua viabilidade e sensibilidade a diferentes tipos de stress.
- IV. Estudo do papel do Yap1 na resposta ao stress induzido por compostos de arsénio, nomeadamente o arsenato (AsV).

MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I

Para a disrupção dos YAPs foram usadas as seguintes estirpes (Tabela 2):

Tabela 2: Estirpes de *S. cerevisiae* usadas neste estudo.

Estirpe	Genótipo	Fonte
FY1679	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995, [68]
FY1679	<i>MATα his3-200 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1 his3Δ200 GAL2</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995, [68]
BY 4741	<i>MATα his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> (isogénica da estirpe FY)	EUROSCARF
FY Δ 1	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2 yap1::kanMX4</i>	Neviit <i>et al.</i> , 2004, [48]
FY Δ 4	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2 yap4::kanMX4</i>	Neviit <i>et al.</i> , 2004, [48]
BY Δ 3	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yap3::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY Δ 6	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yap6::kanMX4</i>	EUROSCARF

1. Geração da cassette de disrupção loxP-kanMX4-loxP

A disrupção dos YAP's nas diversas estirpes foi realizada usando cassetes de kanamicina com sequências homólogas flanqueantes curtas. O plasmídeo pUG6 (Anexo), contendo o módulo loxP-KanMX4-loxP, foi construído por modificação do plasmídeo pFA6-KanMX4 [69].

Para todos os YAPs foram usados dois primers (S1 e S2; Tabela 3, Anexo) contendo na extremidade 5' 45-55 nucleótidos complementares à sequência do YAP alvo e na extremidade 3' 19-22 nucleótidos homólogos às regiões da cassette kanMX4. Estes primers e o pUG6 (DNA molde) foram usados para amplificar, por PCR, fragmentos de DNA contendo o marcador selectivo kanMX4 flanqueado por pequenas sequências homólogas ao YAP alvo.

2. Transformação de *S. cerevisiae*

O método de transformação mais usado e conveniente consistiu no tratamento das células com um sal alcalino, o acetato de lítio (LiAc), seguido de incubação com o DNA (loxP-kanMX4-loxP) e PEG [70].

2.1 Células competentes

O procedimento de transformação de leveduras usado foi o protocolo descrito por Gietz *et. al.*, [70] com modificações. Células em fase estacionária foram ressuspensas em meio YPD a uma O.D.₆₀₀ de partida de 0.07-0.1 e cresceram a 30°C com agitação até atingirem uma O.D.₆₀₀ 0.7. Posteriormente, as células foram centrifugadas, ressuspensas em água destilada estéril e transferidas para um tubo Eppendorf de 1.5 mL. Depois de centrifugadas mais uma vez as células foram ressuspensas em TE 1X/LiAc 100mM estéril preparado de fresco e guardadas a 4°C.

2.2 Método de Transformação

Para a interrupção dos YAP's foram usados cerca de 5 µg de DNA da cassete de interrupção loxP-kanMX4-loxP, 50 µg de DNA desnaturado de esperma de salmão (10 mg/mL) e 50 µL de células competentes, às quais foi adicionada solução PEG 3350 40%. As células foram incubadas a 30°C durante 30 minutos com agitação constante e de seguida a 42°C durante 15 minutos (Figura 8). De seguida foi adicionada água destilada estéril à mistura de transformação, a qual foi centrifugada e ressuspensa em YPD. As células foram incubadas, novamente, a 30°C durante 2-3 horas para permitir a sua recuperação e por fim plaquearam-se em meio YPD sólido com o marcador de selecção G-418 (GIBCO-BRL). As placas foram incubadas a 30°C durante 2 dias até ao aparecimento de colónias.

2.3 Verificação da integração correcta de kanMX4

A integração correcta do marcador kanMX4 no *locus* genómico respectivo foi verificada por PCR [71]. Foram desenhados primers específicos para as regiões promotora (A1) e terminadora (A4), para as regiões internas de cada YAP (A2 e A3) e para a região interna da cassette kanMX4 (k2, k2c, k3 e k3c) (Tabela 3, Anexo). Os transformantes com resistência ao antibiótico G-418 foram seleccionados e testados por PCR (Figura 8). O DNA amplificado foi submetido a electroforese em gel de agarose 1% para análise do tamanho das bandas e validação da recombinação correcta entre a cassette e o YAP em estudo.

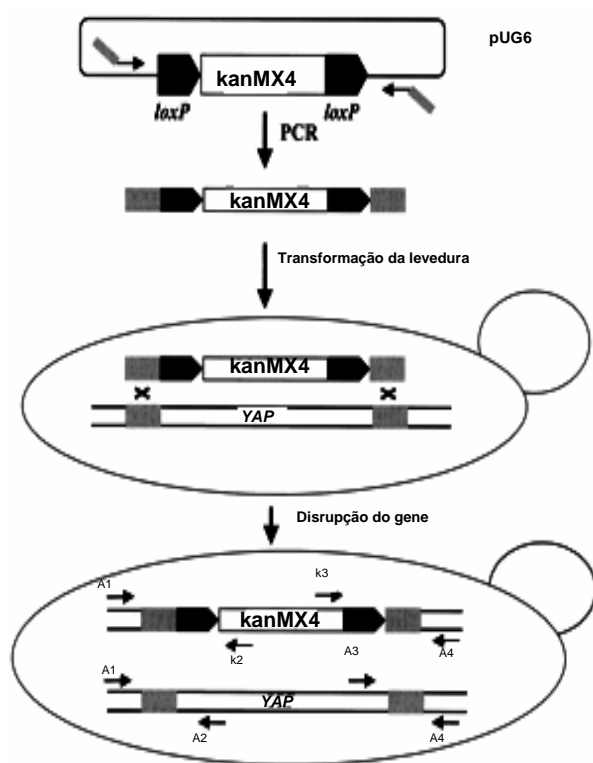


Figura 8: Esquema do procedimento de interrupção dos YAP's pelo gene marcador kanMX4 ([72], com modificações).

3. Remoção da cassete loxP-kanMX4-loxP

3.1 Transformação da *S. cerevisiae* com pSH47

As estirpes mutantes (*yap::kanMX4*) foram transformadas com o plasmídeo pSH47 (Anexo) que expressa a recombinase Cre sob controlo do promotor *GAL1* e que contem o marcador *URA3*. A expressão da recombinase Cre foi induzida através da mudança das células do meio YPD (glucose) para o meio YPG (galactose) (Figura 9). A incubação das células durante 30 minutos a 1 hora foi suficiente para a remoção do gene marcador *kan^r* de algumas das células resistentes a G-418. A perda do gene *kan^r* foi analisada por PCR e a remoção do pSH47 foi obtida a partir de plaqueamentos sucessivos em meio contendo 5-ácido fluorótico (5-FOA), o qual não permite o crescimento das células que expressam o marcador *URA3*.

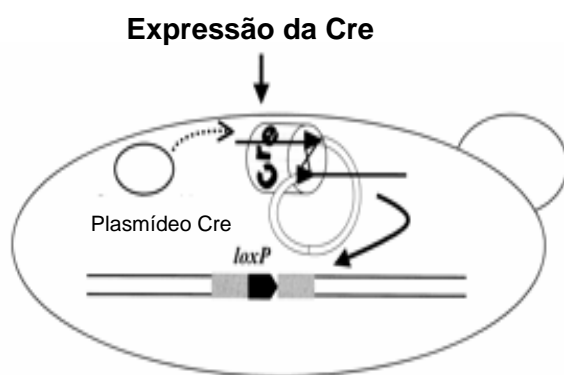


Figura 9: Representação esquemática da remoção do gene marcador kanMX4 através do sistema *Cre/loxP* ([72], com modificações)

PARTE II

4. Análise das tetradas de levedura pelo método de Matt Kaeberlein

4.1 Esporulação

As células diplóides foram incubadas durante a noite a 30°C em meio YPD, centrifugadas e ressuspensas em acetato de potássio (KOAc) 2% suplementado com os aminoácidos para os quais cada estirpe é auxotrófica (concentração final 1% de cada aminoácido). As células foram incubadas à temperatura ambiente durante aproximadamente 8 horas, com agitação e posteriormente incubadas a 30°C até ao aparecimento das tetradas que foram visualizadas ao microscópio óptico.

4.2 Protocolo de dissecação de tetradas

Foram retirados 200µL da solução KOAc 2% contendo os esporos, centrifugados à velocidade máxima durante 30 segundos e lavados com água destilada estéril. Os esporos foram novamente centrifugados, ressuspensos em 200µL de Zimoliase 0.5 mg/mL e incubados durante 15 minutos a 37°C.

Aliquotas de 20 µL de esporos foram espalhadas na superfície lateral do meio sólido YPD. As tetradas foram dissecadas usando o sistema “Singer Instruments MSM” (Figura 10). Os esporos dissecados foram incubados a 30°C durante aproximadamente 2 dias.

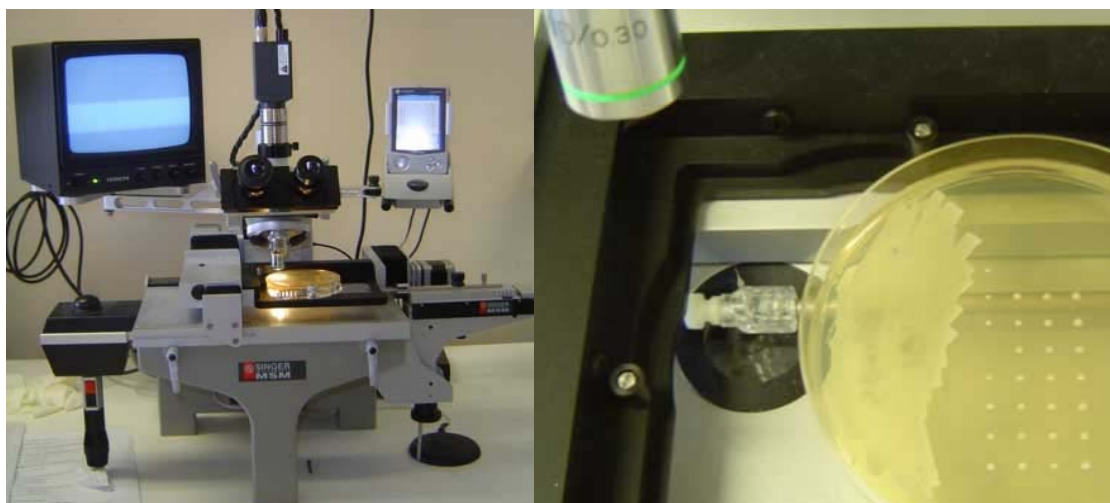


Figura 10: Sistema “Singer Instruments MSM” para a dissecação de tetradas.

PARTE III

5. Testes fenotípicos

Foram preparadas placas de cultura contendo quantidades apropriadas (ver capítulo dos resultados e discussão-parte III) de vários agentes de stress, tais como, Dietilmaleato (DEM), N-etilmaleimida (NEM), Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2), Cloreto de sódio (NaCl), Cádmio (Cd), etc. As células foram incubadas até à fase exponencial ($O.D._{600}$ 0.4-0.5) e diluídas de modo a que cada “spot” de 5 μ L contivesse aproximadamente 2000, 200 e 20 células. Para tal, assumiu-se que uma $O.D._{600}$ 0.1 representa aproximadamente $2,5 \times 10^7$ cel/mL. As mesmas diluições foram depositadas nas placas controlo (sem agentes de stress).

PARTE IV

6. Purificação e análise de proteínas

6.1 Extracção de proteínas totais – Método TCA

Mutantes FY α *yap1* transformados com a construção *myc-YAP1* foram incubados a 30°C com agitação até atingirem a fase exponencial ($O.D._{600}$ 0.4). Para extracção de proteínas totais foram recolhidos 15 mL da suspensão celular em condições fisiológicas e a diferentes tempos após a adição de AsV 2 mM. As células foram centrifugadas, lavadas com 20% de TCA e o pellet celular foi armazenado a -80°C. As células foram ressuspendidas em 20% de TCA e foram adicionadas pérolas de vidro. A parede celular foi lisada mediante 4 a 6 períodos de 1 minuto de agitação alternados por incubação em gelo. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado 5% de TCA. As células foram novamente agitadas durante 20 segundos e o sobrenadante foi adicionado ao anterior.

As células lisadas foram centrifugadas, o precipitado foi dissolvido em tampão Laemmli, incubado a 90-95°C durante 5 minutos e novamente centrifugado. O sobrenadante foi removido e as proteínas foram quantificadas pelo Método de Bradford (Bradford–BIORAD). Todo o procedimento foi executado à temperatura de 4 °C.

6.2 SDS-PAGE

Os geis de resolução de poliacrilamida 10% (w/v) foram preparados misturando diferentes componentes nas seguintes proporções: 4 mL de 30% (w/v) acrilamida/bis-acrilamida (30:0.4), 3 mL de Tris 1M pH 8.8, 120 µL de SDS 10% (w/v), 4,81 mL de H₂O destilada e estéril, 80 µL de PSA 10% (w/v) e 8 µL de TEMED. Após a polimerização do gel de resolução foi preparado o gel de concentração misturando os seguintes componentes: 776 µL de acrilamida/bis-acrilamida (30:0.4), 500 µL de Tris 1M pH 6.8, 40 µL de SDS 10% (w/v), 2.65 mL de H₂O destilada e estéril, 40 µL de PSA 10% (w/v) e 6 µL de TEMED. Após a polimerização do gel os poços foram lavados com tampão de corrida SDS-PAGE 1X (stock 10X: Tris 250 mM, glicina 2 M e 1% (w/v) de SDS). A electroforese foi realizada no sistema BioRad Mini-Protean II e decorreu a 15 V/cm em tampão de corrida SDS-PAGE 1X até as amostras atingirem o final do gel.

6.3 Transferência das proteínas para o suporte sólido

Após a electroforese o gel contendo as amostras de proteína foi imediatamente embebido em tampão de transferência durante 10 minutos. Três folhas de papel MM (Whatman) do tamanho do gel foram previamente embebidas no mesmo tampão de transferência e colocadas no anodo do aparelho de transferência “ATTA Trans-Blot SD Transfer Cell”. A membrana de nitrocelulose previamente molhada em água destilada estéril e de seguida em solução de transferência foi colocada cuidadosamente em cima das folhas de papel MM e o gel foi colocado sob mais 3 folhas de papel MM. O cátodo foi colocado sobre a montagem de transferência e a corrente eléctrica foi ajustada para 250-350 mA durante 15 minutos.

A eficiência de transferência das proteínas foi assegurada incubando-se a membrana em solução Ponceau S.

6.4 Imunodeteccção das proteínas imobilizadas – Western Blotting

A membrana de nitrocelulose foi imersa em 50 mL de T1 (PBS 1X, 0.1% Tween 20) com 5% (w/v) de leite em pó e incubada à temperatura ambiente durante 60 minutos, com agitação lenta de modo a bloquear-se a absorção não-específica de reagentes imunológicos. A membrana foi lavada duas vezes com a mesma solução e incubada com o anticorpo anti-*myc* diluído (1:20 000) em 1X PBS, 0.1% Tween 20 e 1% (w/v) de leite em pó. O tempo de incubação que variou entre 1-14 horas à temperatura ambiente dependeu do anticorpo específico usado. Posteriormente a membrana foi lavada três vezes durante 10 minutos com 100 mL de solução T1 e incubada em 10 mL de 1X PBS, 0.1% Tween 20 e 1% (w/v) de leite em pó contendo uma diluição de 1:4000 do anticorpo secundário, “horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG” (Amersham, Pharmacia), durante 60 minutos (Figura 11). A membrana foi lavada novamente com 100 mL de T3 (1X PBS, 0.3% Tween 20) três vezes durante 10 minutos e com agitação. Finalmente a detecção foi realizada usando o sistema de detecção quimio-iluminescente ECL (Amersham, Pharmacia). A membrana foi então exposta a um filme autoradiográfico (Hyperfilm MP, Amersham).

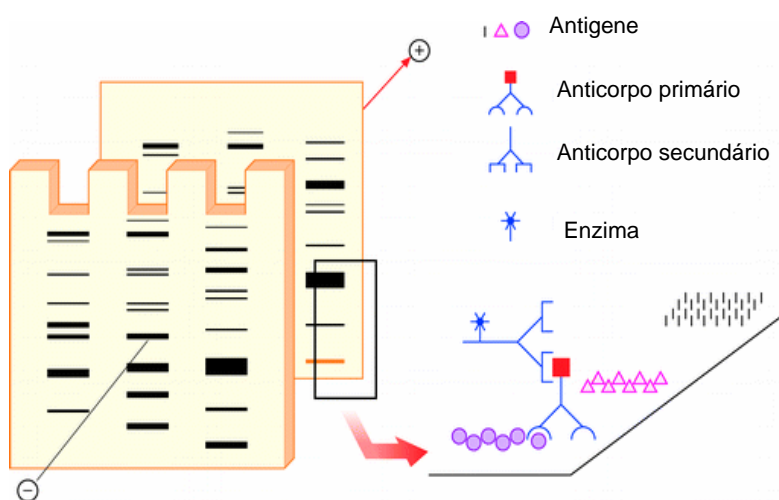


Figura 11: Princípio geral da técnica Western Blotting. As bandas das proteínas no gel são electrotransferidas para a membrana e subsequentemente reconhecidas pelo anticorpo primário. Após lavagem, o anticorpo primário ligado é detectado pelo anticorpo secundário conjugado com uma enzima que provoca o aparecimento do sinal após a adição do substrato apropriado (www.els.net, com modificações).

7. Análise de células GFP por microscopia de imunofluorescência

Uma cultura de células transformadas com a fusão GFP-Yap1 e GFP-Yap8, em fase estacionária, foi diluída para O.D.₆₀₀ 0.1 em meio fresco e incubada até atingir uma O.D.₆₀₀ 0.4. De seguida foram submetidas ao stress com AsV 2mM e a diferentes tempos foram retirados 600 µL aos quais foi adicionado 1mg/mL de DAPI. As células foram centrifugadas durante 5 minutos, lavadas com PBS 1X e ressuspensas em DABCO (glicerol 75%, PBS 0.25X e 1,4 diazabícclo [2.2.2] octano). As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência LEICA DMRXA equipado com uma camara Roper Scientific Micro-Max cooled CCD e um software MetaMorph (Universal Imaging, Inc.).

Capítulo

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. OBTENÇÃO DOS MUTANTES

PARTE I

Em 1996 foi publicada a sequência completa do genoma da *S. cerevisiae*, o que implicou que a análise funcional de mais de 6000 genes encontrados neste organismo entrasse numa nova fase [72].

A disrupção de genes é uma das principais metodologias usadas no estudo das suas respectivas funções, tendo atingido um avanço rápido quando a sequência do genoma foi conhecida. Apenas pequenas sequências homólogas ao gene alvo localizadas em ambas as extremidades do gene marcador foram suficientes para a integração eficiente deste no genoma da levedura por recombinação homóloga. A eficiência desta recombinação dependeu principalmente do tamanho das regiões flanqueantes homólogas ao gene alvo na cassette de disrupção.

1. Disrupção dos genes *YAP2*, *YAP5*, *YAP6* e *YAP7*

Uma das etapas mais importantes deste trabalho foi a construção da cassette de disrupção contendo o gene marcador *kan^r*, o qual confere resistência ao antibiótico G-418 (gentamicina). Para este fim, foram usados rotineiramente, 2 oligonucleótidos de aproximadamente 60 nucleótidos de comprimento (contendo nas extremidades 3' cerca de 20 nucleótidos homólogos às sequências do marcador kanMX4 e nas extremidades 5' cerca de 40 nucleótidos homólogos à sequência do gene a ser disrompido) (Figura12).

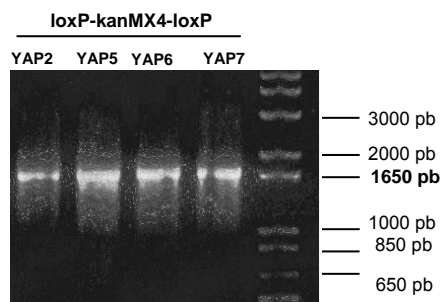


Figura 12: Para a disrupção dos respectivos YAPs foram construídas por PCR as cassetes loxP-kanMX4-loxP usando os respectivos primers, o que corresponde à obtenção de bandas com cerca de 1650pb.

Para a disrupção dos vários YAPs foram utilizadas as estirpes FY1679 e BY4741, as quais descendem directamente da S288C original, usada na sequenciação do genoma de *S. cerevisiae*, e estão descritas na tabela 3.

A transformação destas estirpes com as respectivas cassetes de disrupção, originou, cerca de 10 a 20 colónias, resistentes à kanamicina, para cada YAP alvo.

Tabela 3: Estirpes de *S. cerevisiae* transformadas com as diferentes cassetes de disrupção.

Estirpe	Genótipo
FY1679	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2</i>
BY 4741	<i>MATα his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> (isogénica da estirpe FY)
Fyyap1	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2 yap1::kanMX4</i>
Fyyap4	<i>MATα his3-200 ura3-52 GAL2 yap4::kanMX4</i>
Byyap3	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; yap3::kanMX4</i>
Byyap6	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; yap6::kanMX4</i>

O diagnóstico por PCR dos transformantes seleccionados, usando os primers A1, A4, k2 (Tabela 3, Anexo) permitiu confirmar a integração correcta da cassette no *locus* genómico do *YAP2*. Na figura 13, através da análise do tamanho das duas bandas obtidas observa-se que na primeira linha o *YAP2* foi correctamente substituído pela cassette de disrupção, o que corresponde a uma banda de 850 pb.

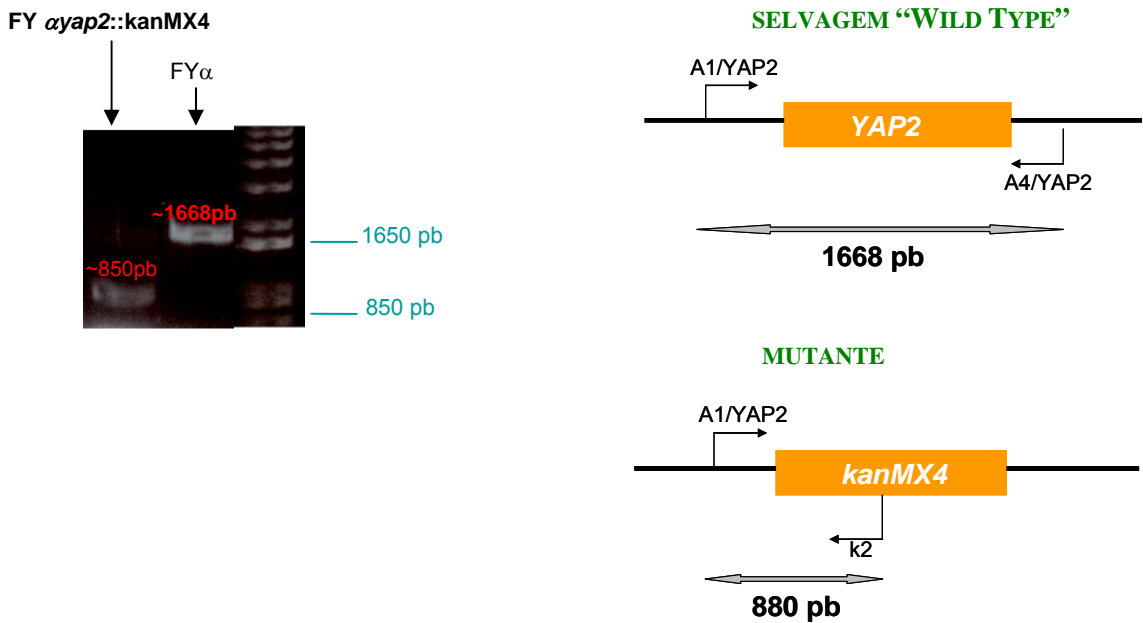


Figura 13: Disrupção do YAP2 na FY α .

O *YAP5* foi disrompido na estirpe *FYα yap4*, da qual foi previamente retirada a cassette de kanamicina, de modo a obter-se o duplo mutante *FYα yap4 yap5::kanMX4*.

Através da reacção de PCR, na qual se usaram os primers específicos do *YAP5* e da cassette de disrupção, confirmou-se a integração de *loxP-kanMX4-loxP* no local genómico correcto. A estirpe selvagem *FYα* foi utilizada como controlo para demonstrar que o gene *YAP5* estava intacto na estirpe *FYα yap4* (Figura 14).

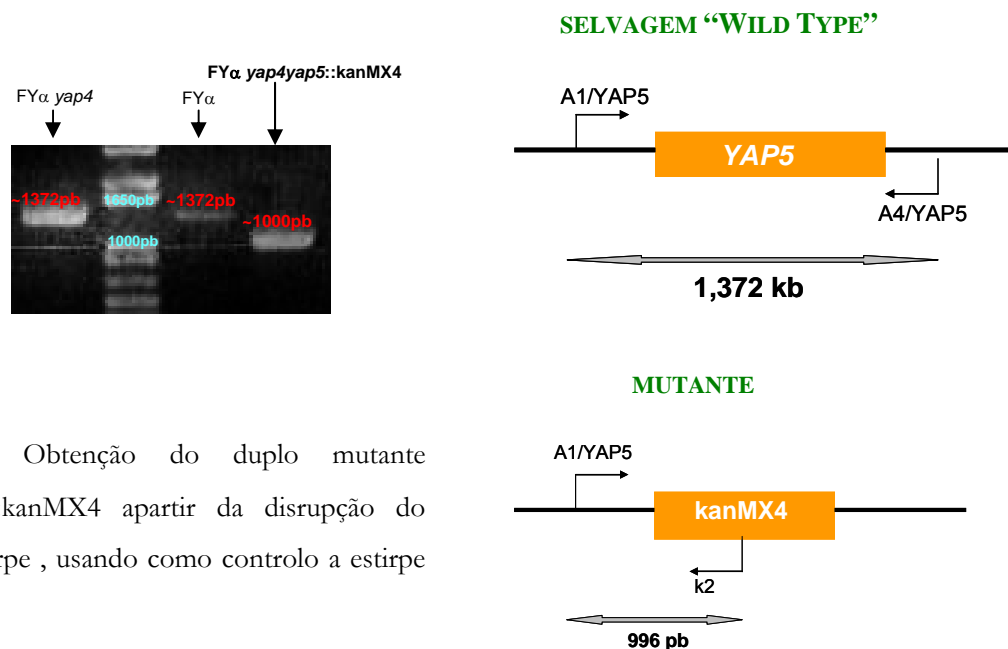


Figura 14: Obtenção do duplo mutante *FYα yap4 yap5::kanMX4* a partir da disrupção do *YAP5* na estirpe , usando como controlo a estirpe *FYα yap4*.

Com o objectivo de se disromper o *YAP6* num mutante *FYα yap4* obtendo-se o duplo mutante *FYα yap4 yap6::KANMX4* para posteriores estudos fenotípicos, amplificou-se a cassette de kanamicina, por PCR, a partir da estirpe *BYa yap6::kanMX4*. Usando os primers A1 e A4 específicos do *YAP6* obteve-se uma cassette de disrupção com cerca de 2,200 Kb (*KANMX4*) em vez de 1,650Kb (*kanMX4*) da cassette original. Esta amplificação da cassette permitiu aumentar a homologia das sequências flanqueantes com o *YAP6* facilitando a recombinação com a cassette de disrupção. Para confirmação da integração correcta da cassette amplificada, usaram-se os primers H3 (GTCAAAGCTTCATGGAAGTGGAGAGTAATG) e A2 específicos do *YAP6* e o primer k2 específico da cassette de disrupção (Figura 15).

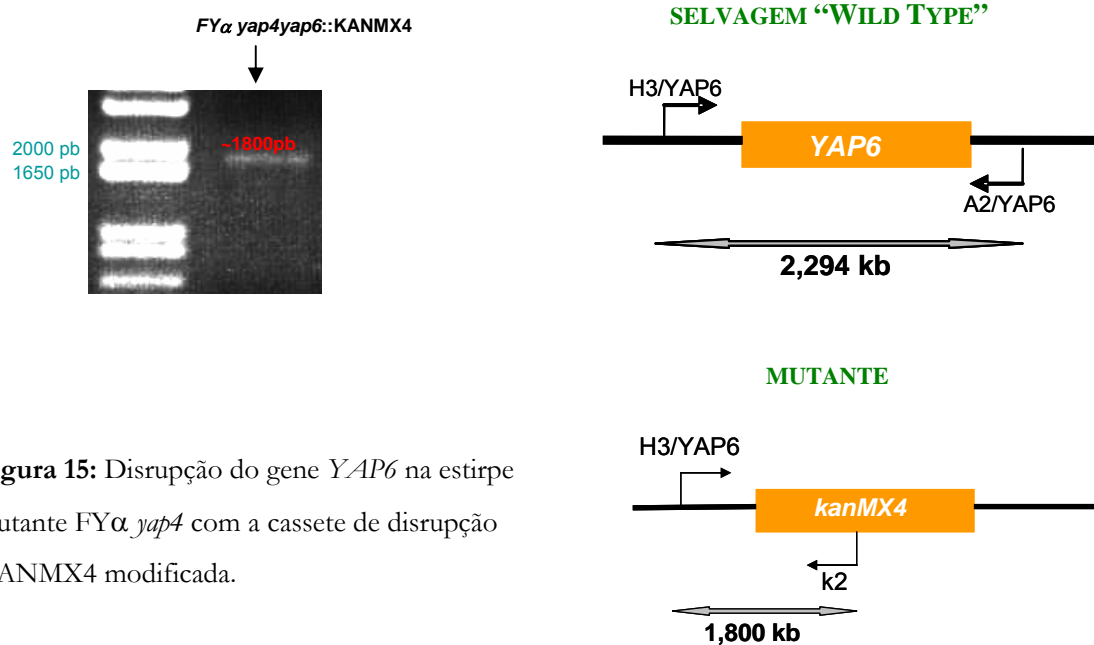


Figura 15: Disrupção do gene *YAP6* na estirpe mutante FYα *yap4* com a cassette de disrupção KANMX4 modificada.

Uma vez que todas as estirpes mutantes apresentavam um “mating type” α, o *YAP7* foi então disrompido na estirpe selvagem diplóide (Figura 16) com o objectivo de se obter, por esporulação, um mutante com “mating type” a, para ser utilizado em conjugações posteriores com mutantes α. Como controlo usaram-se as estirpes haplóides selvagens FYα e FYa.

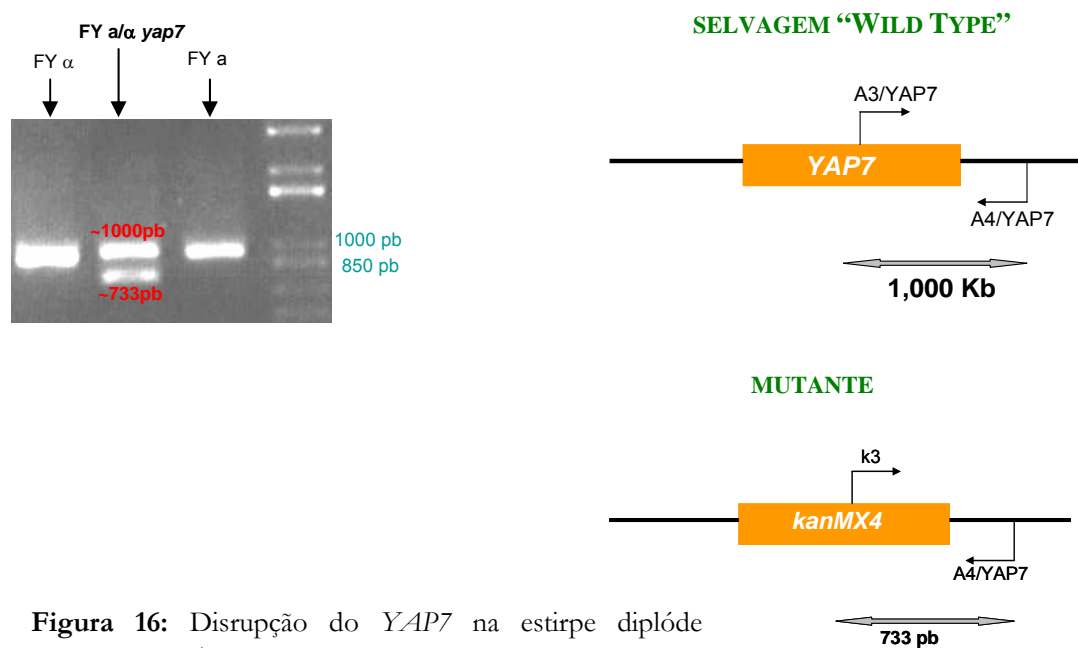


Figura 16: Disrupção do *YAP7* na estirpe diplóide selvagem FYa/α.

2. Remoção do gene marcador *kan^r*

Um dos objectivos deste trabalho foi combinar as vantagens do sistema de disrupção de genes pelo marcador *kan^r* com o sistema de recombinação Cre-*loxP* para a sua posterior remoção. O uso repetido do marcador *kan^r* na disrupção de vários genes numa mesma estirpe implicou que fosse necessário a sua remoção. Para isso as estirpes mutantes foram transformadas com o plasmídeo pSH47 (Anexo) que codifica a recombinase Cre sob controlo do promotor *GAL1* e o gene marcador *URA3*. A indução da expressão da recombinase através do crescimento das células em meio contendo galactose permitiu a remoção do gene marcador *kan^r* em aproximadamente 80% das células. Tal como na etapa de integração da cassette *loxP-kanMX4-loxP* a sua remoção também foi analisada por PCR.

- **Kan^r foi eficientemente removido:**

O gene marcador *kan^r* foi removido em paralelo nos mutantes FY α *yap1::kanMX4* e FY α *yap4::kanMX4*. A confirmação da remoção da cassette foi realizada usando o par de primers A1 e A4 (Tabela 3, Anexo) específicos de cada gene *YAP1* e *YAP4*, (Figura 17).

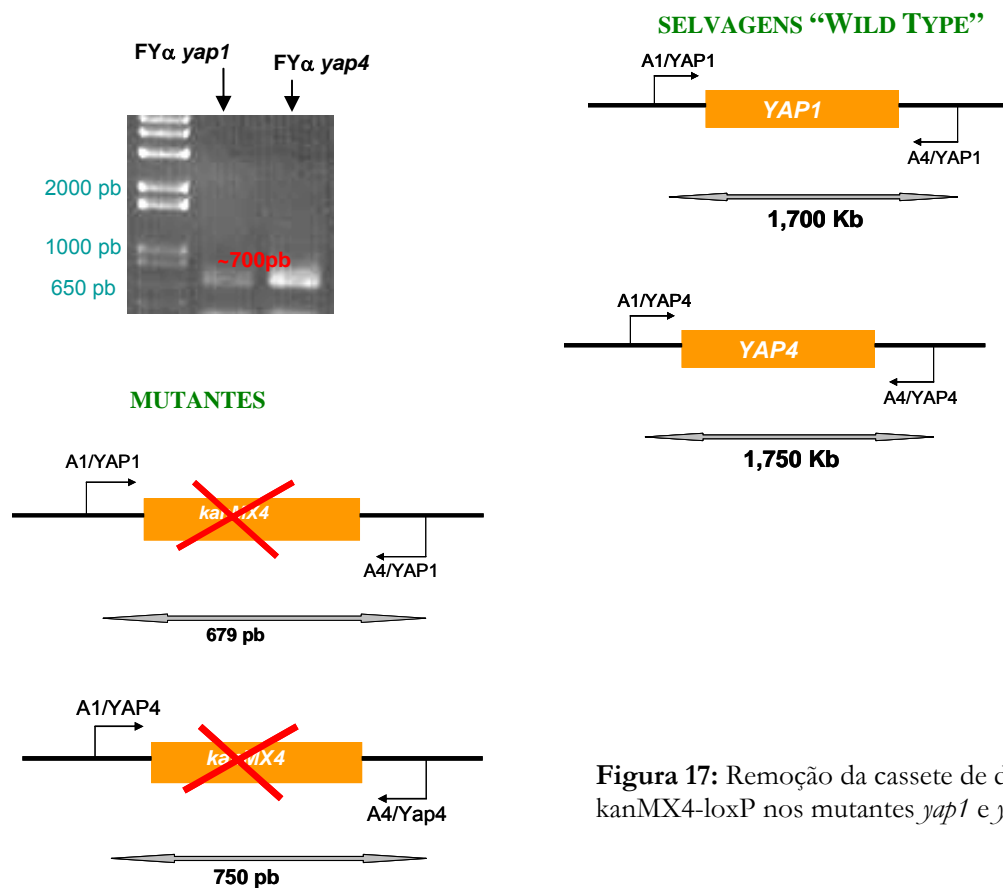


Figura 17: Remoção da cassette de disrupção *loxP-kanMX4-loxP* nos mutantes *yap1* e *yap4*.

Ao mutante $FY\alpha yap2::kanMX4$ também foi removida a cassette de kanamicina (Figura 18). No gel de electroforese podemos observar que o produto amplificado apresenta o tamanho de aproximadamente 668 pb, e não de 2318 pb que corresponde ao tamanho do *locus* genómico do *YAP2* com *kanMX4*.

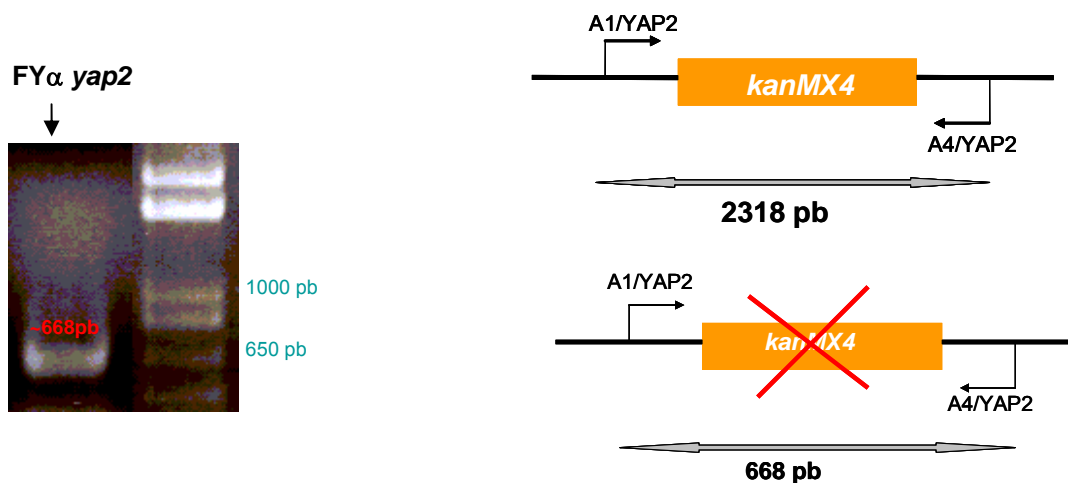


Figura 18: Remoção da cassette de interrupção loxP-kanMX4-loxP do *locus* do *YAP2*.

A cassette também foi removida em $FY\alpha yap4yap5::kanMX4$ (ver figura 14), com o objectivo de se usar este duplo mutante “limpo” para a conjugação com outros mutantes de “mating type” a fim de se obter o triplo mutante. Na figura 19, a banda de ~650 pb, corresponde ao tamanho pretendido, 634 pb, que por sua vez corresponde ao *locus* genómico do *YAP5* sem a cassette de kanamicina.

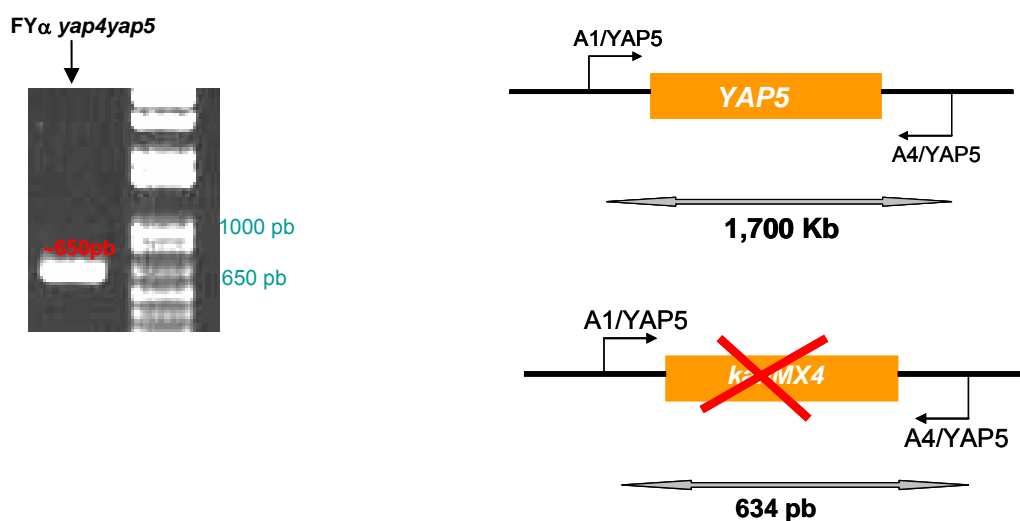


Figura 19: Remoção da cassette loxP-kanMX4-loxP no mutante $FY\alpha yap4yap5::kanMX4$.

A cassette loxP-kanMX4-loxP foi removida em ambas as estirpes haplóides FY α *yap7* e FY α *yap7*, como se pode observar na figura 20. Comparando o tamanho do produto amplificado pelos primers A1 e A4 quando está ou não present o *YAP7* ou a cassette de interrupção, verificamos que a banda com 650 pb obtida no gel corresponde ao mutante *yap7* “limpo”.

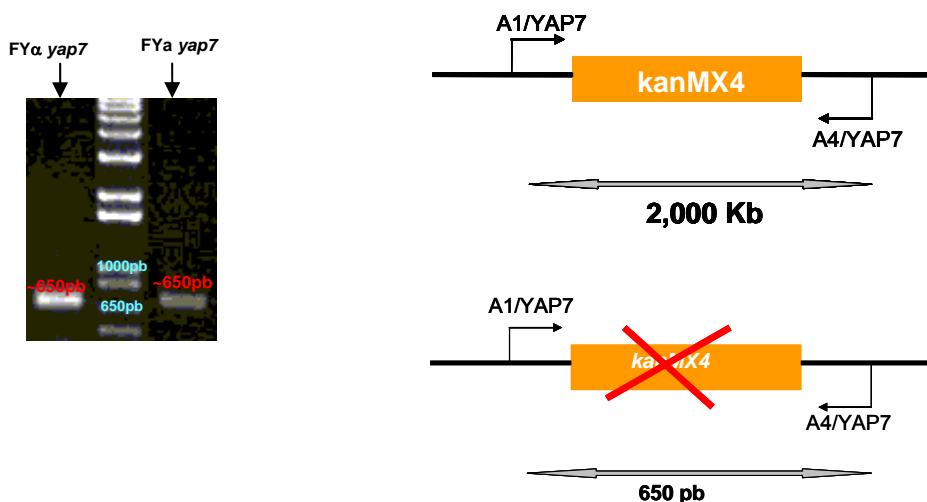


Figura 20: Remoção da cassette de interrupção loxP-kanMX4-loxP no *locus* do *YAP7*.

3. Análise das tetradas dissecadas

A análise de tetradas consiste no estudo individual dos quatro produtos do processo meiótico. Durante a meiose a célula reorganiza os componentes citoplasmáticos, inicia programas de transcrição e activa vias de biossíntese específicas. Cada cadeia de DNA é replicada, o par de cromossomas homólogos recombina-se e duas divisões celulares ocorrem para gerar quatro células haplóides. Estas quatro células haplóides são designadas de tetradas e em *S. cerevisiae* encontram-se num compartimento denominado de *ascus* (Figura 21). Os *ascopores* ou tetradas, esporos meióticos haplóides de um *ascus* individual, foram isolados com o auxílio do dissecador “Singer Instruments MSM”, analisados por PCR e a segregação dos diferentes marcadores genéticos foi monitorizada através de testes fenotípicos (Tabela 2, Anexo).

A construção de novas estirpes mutantes implicou diferentes etapas: (1) construção do diplóide, (2) esporulação, onde os diplóides foram induzidos a formar esporos, (3) preparação das

tetradas, onde a parede do *ascus* foi removida, e (4) dissecação das tetradas, onde cada um dos quatro esporos haplóides foi depositado na placa e colocados a crescer.

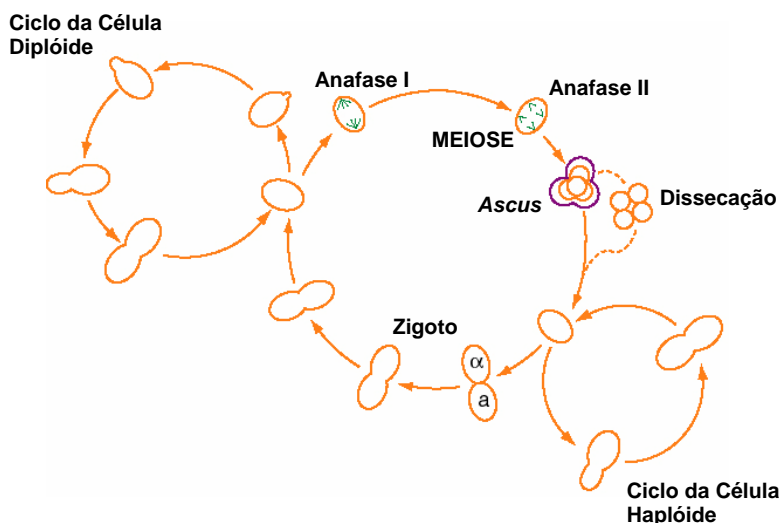


Figura 21: Ciclo de vida da levedura, (<http://www.usask.ca/biology/rank/316/tetrad/tetrad.htm>, com modificações).

Com o objectivo de se obter um mutante cujo “mating type” fosse *a*, colocou-se o diplóide FY *a/α yap7::kanMX4* a esporular, o qual é um processo lento que leva alguns dias ou mesmo semanas. Após o aparecimento de tetradas, estas foram dissecadas e analisadas por PCR. Através da corrida em gel de algumas amostras (Figura 22) observou-se que as tetradas correspondem a células haplóides com o *YAP7* disrompido. Como controlo usaram-se as estirpes diplóide *yap7* e haplóide selvagem através das quais se obtiveram duas bandas de 1000pb que correspondem ao gene *YAP7* intacto e uma banda de 733pb que corresponde ao *YAP7* substituído pela kanamicina.

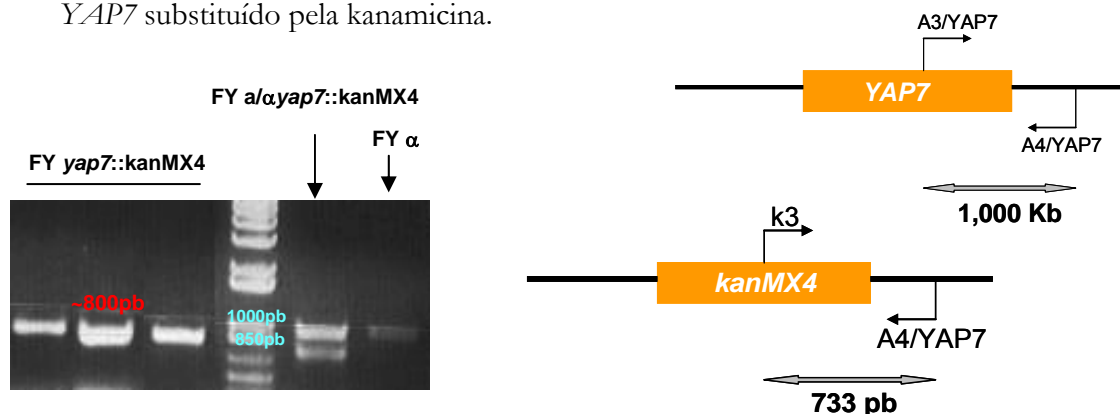


Figura 22: Diagnóstico por PCR das tetradas obtidas por esporulação do diplóide FYa/*α yap7::kanMX4*.

Uma vez identificados os haplóides *yap7*, foram analisados os auxotrofismos das mesmas através do seu crescimento em diferentes combinações de meios selectivos. A identificação do “mating type” de cada mutante haplóide, foi realizada através da construção de diplóides, (Tabela 5).

Apartir da conjugação do mutante FY *yap7* com o mutante FY α *yap1* obteve-se o duplo mutante diplóide FY α/α *yap1yap7*. Após esporulação e dissecação das tetradas verificou-se que correspondem ao duplo mutante haplóide *yap1yap7* (Figura 23). Na mesma tetrada, o tamanho das bandas obtidas correspondem ao produto amplificado pelos primers A1 e A4 do *YAP1* e *YAP7*, 679 pb e 650 pb, respectivamente, se se tratar do mutante sem cassette.

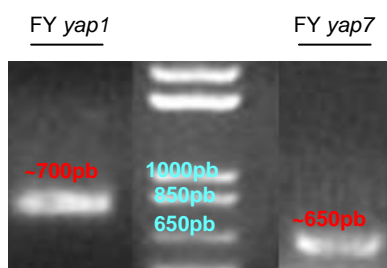


Figura 23: A conjugação das estirpes FY α *yap1* com FY α *yap7* originou o duplo mutante FY *yap1yap7*.

Uma vez isolado e identificado o duplo mutante *yap1yap7*, a etapa seguinte foi caracterizar o seu genótipo e “mating type”, utilizando-se para isso os mesmos procedimentos para os mutantes obtidos anteriormente, (Tabela 5).

Tendo sido identificado o “mating type” da estirpe FY *yap1yap7* como α , esta foi conjugada com BY α *yap3::kanMX4*, o que deu origem ao diplóide LY α/α *yap1yap3::kanMX4yap7*. As tetradas dissecadas foram testadas por PCR usando os primers A1 e A4 específicos para cada *YAP* (Figura 24). De entre as tetradas testadas, algumas apresentaram as três bandas (1000 pb, 750 pb e 650pb) que correspondem ao triplo mutante *yap1yap3::kanMX4yap7*.

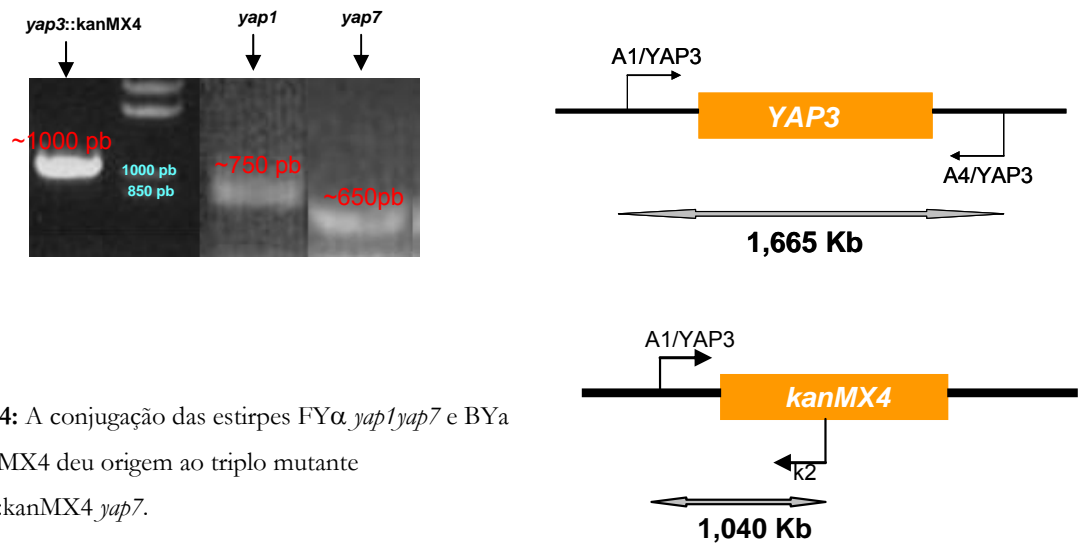


Figura 24: A conjugação das estirpes FY α *yap1yap7* e BYa *yap3::kanMX4* deu origem ao triplo mutante *yap1yap3::kanMX4 yap7*.

A análise dos auxotrofismos do triplo mutante revelou possuírem os fenótipos indicados na tabela 5.

Uma vez obtido o triplo mutante LY*yap1yap3::kanMX4yap7* e o duplo mutante FY α *yap4yap6::KANMX4*, procedeu-se à sua conjugação de forma a obter-se o quintuplo mutante, LY α / α *yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7*. Tal como para os mutantes anteriores, as tetradas oriundas desta conjugação foram analisadas por PCR usando o conjunto de primers adequado (Tabela 4) para cada *YAP* (Figura 25).

Tabela 4: Conjunto de primers usados para testar a ausência de cada *YAP* nas várias tetradas.

			Tamanho da banda pretendida
YAP1	A1	5'-GCTGATCTTACCGTGTG-3'	≅ 700 pb
	A4	5'-TCTCAGCGTTGTGCCATC-3'	
YAP3	A1	5'-CCTAAGACTGTTTGATTAG-3'	≅ 1000 pb
	A4	5'-GAACITTTTACTTAATCCG-3'	
	K2	5'-CTGACCATCTCATCTGTAAC-3'	
YAP4	A1	5'-GCATCATTTACCAAAGTTC	≅ 750 pb
	A4	5'-GCTCCATGACAACATTCG-3'	
YAP6	H3	5'- GTCAAAAGCTTCATGGAACTGGAGAGTAATG -3'	≅ 1800 pb
	A2	5'-TTACGTGGCACTATCCGA-3'	
	K2	5'-CTGACCATCTCATCTGTAAC-3'	
YAP7	A1	5'-CAGCATCTTATGAGCTG-3'	≅ 650 pb
	A4	5'-GTTATTCTTTTGGTTG-3'	

O diagnóstico por PCR, sequencial, das várias tetradas, permitiu definir a tetrada com os cinco YAPs disrompidos, LY $yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7$ (Figura25).

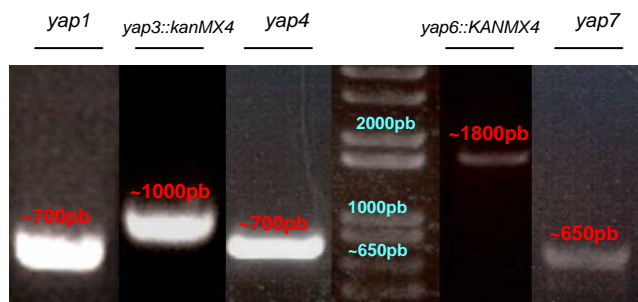


Figura 25: Identificação do quintuplo mutante, LY $yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7$.

O quintuplo mutante também foi analisado em relação aos seus auxotrofismos e respectivo “mating type” (Tabela 5).

Tabela5: “Mating type” dos mutantes obtidos.

ESTIRPE	GENÓTIPO	“MATING TYPE”
FY α	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
FY a	<i>his3-200 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1 his3Δ200</i>	a
BY a	<i>his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	a
BY a $yap3::kanMX4$	<i>his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0, YHL009c::kanMX4</i>	a
FY $\alpha yap4yap6::KANMX4$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
F $\alpha yap1$	<i>his3-200 ura3-52 yap1</i>	α
FY $yap7$	<i>his3-200 ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i>	a
FY $yap7$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
FY $yap7$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
FY $yap7$	<i>his3-200 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	a
FY a $yap7$	<i>his3-200 ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	a
FY $yap1yap7$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
LY $yap1yap3::kanMX4yap7$	<i>his3-200 ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i>	a
LY $yap1yap3::kanMX4yap7$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α
LY $yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7$	<i>his3-200 ura3-52 leu2Δ1 met15Δ0</i>	a
LY $yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7$	<i>his3-200 ura3-52</i>	α

2. ANÁLISE FENOTÍPICA DOS YAPs

PARTE III

1. Sensibilidade dos mutantes a diferentes agentes químicos

Com o objectivo de iniciar a caracterização de alguns *YAPs*, cuja função ainda não é conhecida, bem como o perfil fisiológico do quintuplo mutante, *LYyap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7*, foram realizados alguns testes fenotípicos. Para isso avaliou-se o crescimento das diversas estirpes mutantes em meios de cultura contendo diversos agentes de stress.

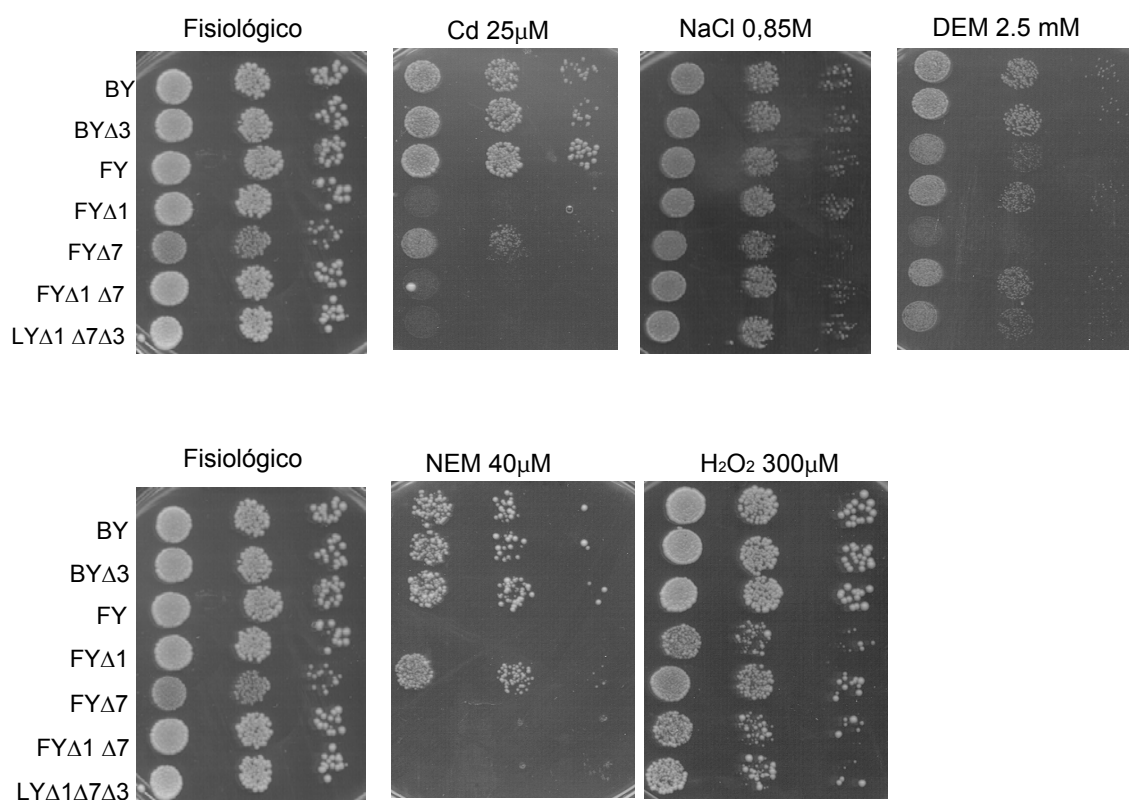


Figura 26: Tolerância dos vários mutantes ao stress induzido por Cádmio (Cd), Cloreto de Sódio (NaCl), Dietilmaleato (DEM), N-etilmaleimida (NEM) e Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂).

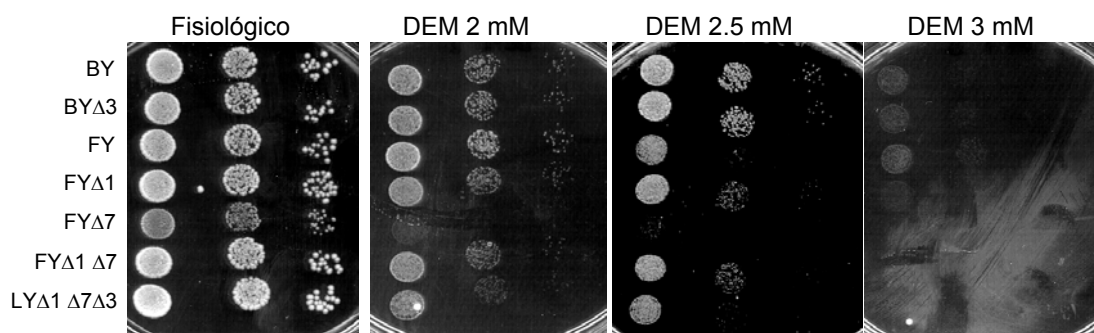


Figura 27: Tolerância dos mutantes ao stress induzido por Dietilmaleato (DEM)

Da análise dos fenótipos obtidos verifica-se que o Yap3 não é sensível a nenhum dos agentes de stress utilizados, de acordo com [5].

De entre os agentes oxidantes já usados para estudar o papel do Yap1 [42,45,73], verificou-se que o *yap7* é sensível ao Dietilmaleato (DEM), um composto oxidante que se conjuga com a glutathione. Apenas a estirpe mutante *yap7* é extremamente sensível ao DEM (2.5 mM), ao contrário do duplo mutante *yap1yap7* e do triplo mutante *yap1yap3::kanMX4yap7* que não apresentam qualquer tipo de sensibilidade a este agente. Provavelmente, a ausência do *yap1*, o protótipo da família Yap, relacionado com a resposta a diversos tipos de stress, active alguma via secundária de destoxificação da célula na presença do DEM.

Inicialmente, *Wanke et. al* [74], mostraram que o tratamento das células com DEM afecta a transição da fase G1 para S do ciclo celular, o que implica a diminuição da taxa de crescimento das células. Recentemente, *Muñoz et. al* [75] identificaram o *YAP7* como um gene supressor positivo da transição G1 para S. Isto permite-nos concluir que existe uma verdadeira relação entre o Yap7 e o agente oxidante DEM, no entanto são necessários mais estudos para podermos decifrar o verdadeiro papel do Yap7.

Segundo *Castillo et. al* [54], o DEM origina uma modificação irreversível de pelo menos dois resíduos de cisteína na proteína Pap1 (Cys 278 e Cys 501) de *Schizosaccharomyces pombe*, através da formação de um tioeter. Esta ligação impede a interacção do NES com Crm1 ficando, assim, o Pap1 retido no núcleo.

A análise da sequência da proteína, revela que o Yap7 não possui resíduos de cisteína, o que dificulta a sua comparação com Pap1 e com os outros membros da família Yap,

nomeadamente com o Yap1, Yap2 e Yap8 envolvidos no stress oxidativo, ao cádmio e aos compostos de arsénio, respectivamente.

A sensibilidade e viabilidade do quintuplo mutante obtido *LYayap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7*, foi avaliada na presença de vários tipos de stress que estão em estudo no nosso laboratório, tais como, o stress induzido pelos compostos de arsénio, cádmio, NaCl, H₂O₂ e DEM.

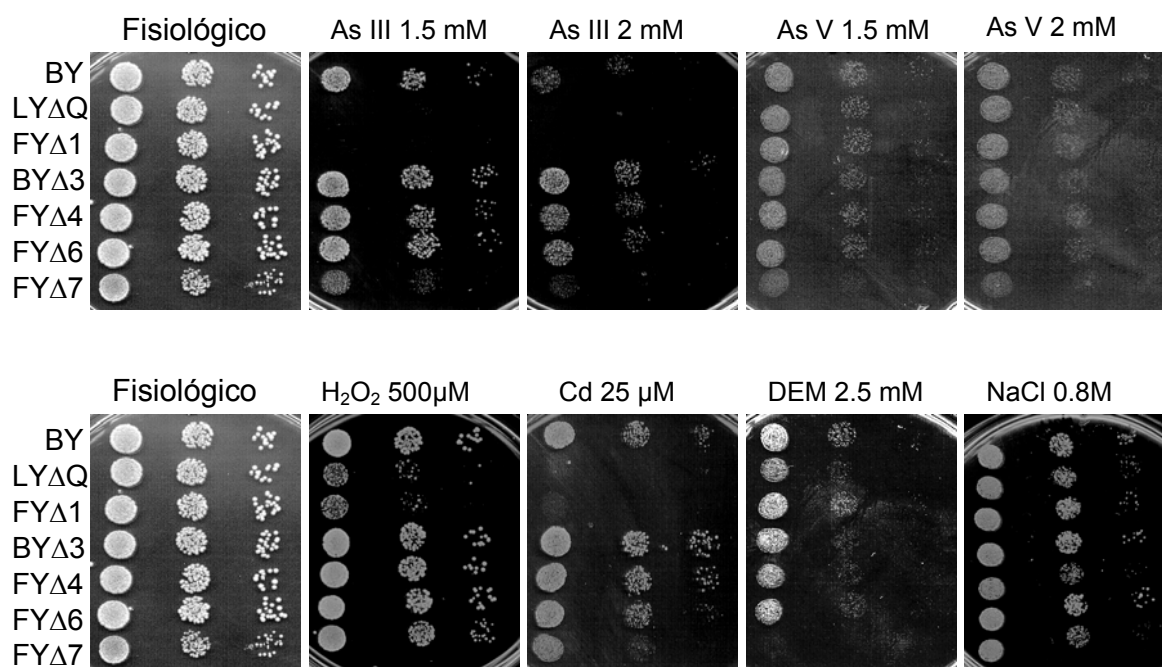


Figura 28: Tolerância do mutante *LYa ΔQ* (*LYayap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7*) ao stress induzido por Arsenito (As III), Arsenato (As V), Peróxido de hidrogénio (H₂O₂), Cádmio (Cd), Dietilmaleato (DEM), e Cloreto de sódio (NaCl).

Como se pode observar na figura 28, o mutante em 5 factores de transcrição da família Yap, dos quais um deles é o *YAP1*, é sensível aos mesmos agentes de stress que o mutante *yap1*. De entre os stresses testados, *LYaΔQ* é resistente ao DEM e NaCl, tal como a estirpe “wild type”.

Curiosamente, *LYaΔQ* parece não revelar sensibilidade ao DEM comparativamente com o mutante simples *yap7*. Por um lado, é possível que algum dos três *YAPs* ainda não removidos

neste quintuplo mutante (*YAP2*, *YAP5* e *YAP8*) esteja a ser activado e a substituir a função dos *YAPs* eliminados. Até agora, tem-se mostrado que todos eles revelam funções sobreponíveis. Por outro lado, a remoção de um ou mais *YAPs* pode estar envolvida na activação de vias secundárias de destoxificação.

3. Yap1 E O STRESS COM AsV

PARTE IV

Com o objectivo de analisar mais detalhadamente a função dos *YAPs* na resposta ao stress, foi avaliado o papel do Yap1 na adaptação das células ao stress induzido pelo arsenato.

1. Participação do Yap1 na resposta ao stress induzido pelo arsenato (AsV)

No nosso laboratório, *Menezes et al.* [64], mostraram que a expressão de *Acr2*, *Acr3* e *Ycf1* induzida pelos compostos de arsénio é principalmente regulada pelo Yap8, no entanto o Yap1 também parece estar de alguma forma envolvido.

De acordo com [64] a activação transcripcional do Yap8 não é o maior determinante da sua activação, uma vez que os seus níveis de mRNA e de proteína são constitutivos e não são induzidos ao longo do tempo pelo tratamento com os compostos de arsénio. No que se refere ao Yap1, a cinética do mRNA indica que ele é moderadamente induzido nas mesmas condições. De modo a verificar se existe algum mecanismo pós-transcricional envolvido na regulação da activação do Yap1 pelo As V, foi monitorizada a cinética da proteína recombinante *myc*-Yap1 por “western-blot”, bem como a sua localização subcelular através da fusão da proteína a GFP (GFP-Yap1) nas mesmas condições testadas para o Yap8 [64].

Tal como o Yap8, o Yap1 aparece predominantemente localizado no citoplasma em condições fisiológicas e redistribuído pelo núcleo 10 minutos após o tratamento com arsenato 2 mM (Figura 30), provavelmente devido a este composto precisar de uma etapa de redução a arsenito, na qual o Yap1 também parece participar.

Os resultados obtidos por “western-blot” estão coerentes com os níveis de mRNA, indicando não existir nenhum mecanismo pós-transcricional, observando-se uma ligeira indução da proteína Yap1, principalmente aos 45 e 90 minutos, comparativamente com o Yap8, indicando assim a possível participação do Yap1, na resposta ao stress induzido pelos compostos de arsénio, numa fase tardia (Figura 29).

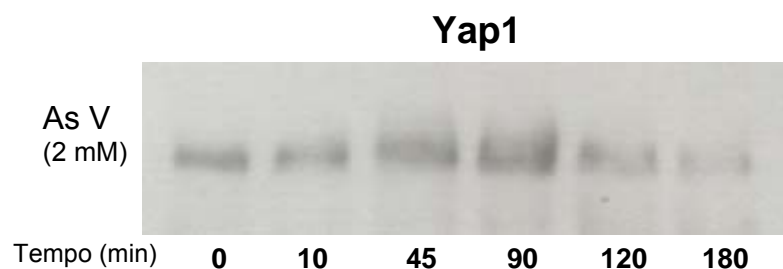


Figura 29: Análise da expressão da proteína *myc*-Yap1 por “western blotting” sob indução de arsenato.

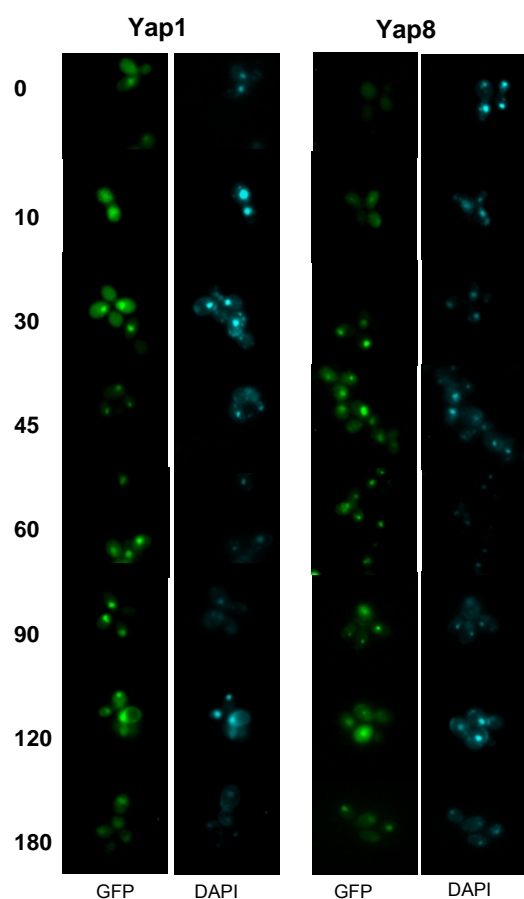


Figura 30: Yap1 e Yap8 redistribuídos pelo núcleo sob tratamento com arsenato (AsV) 2 mM.

Capítulo

5

CONCLUSÃO

1. OBTENÇÃO DE MUTANTES

Dos oito genes pertencentes à família YAP, quatro deles (*YAP2*, *YAP5*, *YAP6* e *YAP7*) localizados respectivamente nos cromossomas IV, IX, IV, XV da *S. cerevisiae* foram disrompidos através da recombinação homóloga entre uma cassette de kanamicina e o YAP alvo. Para tal, utilizaram-se a estirpe selvagem FY1679 e as estirpes mutantes FY α *yap1* e FY α *yap4*.

A disrupção dos YAPs, bem como a identificação dos clones positivos através do uso de técnicas baseadas na Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) apresentou inúmeras vantagens, tais como a rapidez da amplificação das cassetes de disrupção loxP-kanMX4-loxP sem ser necessário recorrer a técnicas de clonagem e de diagnóstico de clones positivos, suprimindo as análises de fragmentos de restrição. A verificação da integração genómica correcta, também foi mais conveniente e adequada através de diagnóstico por PCR, permitindo-nos uma análise funcional mais rápida. Em suma, os métodos de disrupção de genes e selecção baseados na técnica de PCR são mais precisos, mais rápidos e mais económicos que os métodos clássicos.

A utilização de primers contendo aproximadamente 40-55 pares de bases homólogos ao YAP alvo para a construção da cassette de disrupção permitiu a sua integração eficaz no locus genómico correcto.

A cassette loxP-kanMX4-loxP, contendo pequenas sequências flanqueantes homólogas ao YAP alvo, desempenhou um papel importante na disrupção dos YAPs. Através da expressão da recombinase Cre o módulo kanMX4 foi eficientemente removido mediante a recombinação entre os domínios loxP. Isto permitiu o uso repetido do gene marcador *kan^r* na obtenção dos mutantes duplos, triplos e assim sucessivamente, o que poderá vir a ser uma das principais vantagens para a análise funcional dos genes desta família YAP.

Uma vez obtidos os mutantes simples, duplos e triplos, estes foram conjugados e por esporulação e análise de tetradas obteve-se uma estirpe mutante em cinco YAPs, a qual se designou LY*yap1yap3::kanMX4yap4yap6::KANMX4yap7* (Tabela 6).

Tabela 6: Estirpes mutantes de *S. cerevisiae* obtidas.

Estirpe	Genótipo
FY Δ 1	MAT α his ura
FY Δ 2	MAT α his ura
FY Δ 4	MAT α his ura
FY Δ 7	MAT α his ura
FY Δ 7	MATa his ura trp leu
FY Δ 4 Δ 5	MAT α his ura
FY Δ 4 Δ 6	MAT α his ura <i>yap6::KANMX4</i>
FY Δ 1 Δ 7	MAT α his ura
FY Δ 1 Δ 7	MATa his ura trp leu
LY Δ 1 Δ 7 Δ 3	MAT α his ura <i>yap3::kanMX4</i>
LY Δ 1 Δ 7 Δ 3	MATa his ura trp leu <i>yap3::kanMX4</i>
LY Δ 1 Δ 4 Δ 7 Δ 3 Δ 6	MAT α his ura <i>yap3::kanMX4 yap6::KANMX4</i>
LY Δ 1 Δ 4 Δ 7 Δ 3 Δ 6	MATa his ura met leu <i>yap3::kanMX4 yap6::KANMX4</i>

2. ANÁLISE FUNCIONAL DOS MUTANTES

Estudos fenotípicos dos vários mutantes sob diferentes condições de stress revelaram que o mutante *yap7* é extremamente sensível ao DEM. Esta droga, mesmo em concentrações baixas, inibe a fase de transição G1-S do ciclo celular de *S. cerevisiae*, afectando assim a etapa regulada pela cinase CDC28 [75]. A sensibilidade deste mutante, provavelmente, está relacionada com o facto de que o Yap7 possa ser um supressor positivo desta transição G1/S [74].

Curiosamente, a sensibilidade ao DEM é reduzida nos duplo e triplo mutantes, *yap1yap7* e *yap1yap7yap3* podendo-se, assim hipotetisar que são activadas vias secundárias de destoxificação quando o *YAP1* é removido.

A cooperatividade entre estas vias hipotéticas é uma questão interessante a ser abordada no futuro.

3. Yap1 E O STRESS COM As V

Da análise dos níveis da proteína Yap1 comparativamente com os níveis da proteína Yap8, conclui-se que, embora ambas as proteínas sejam constitutivas, apenas o Yap1 é ligeiramente induzido, ao longo do tempo, na resposta ao stress por arsenato.

Embora a sua disrupção pareça não afectar drasticamente a resistência das células os resultados obtidos confirmam a participação do Yap1 na activação dos genes de destoxificação deste composto.

Perspectivas futuras

- Obtenção de uma estirpe de *S. cerevisiae* mutada em todos os YAPs (supermutante YAP0), a qual será uma ferramenta importante no estudo da função de cada factor de transcrição Yap através da sua super-expressão e respectiva análise fenotípica.
- Estudo da cooperação entre o Yap1 e o Yap8 na resposta ao stress pelos compostos de arsénio através da imunoprecipitação da cromatina e duplo híbrido, “two-hybrid”.
- Análise molecular e bioquímica da função do Yap7 na resposta ao stress celular induzido por DEM. Estudo da cinética do mRNA e da proteína, bem como dos seus locais de fosforilação tendo em conta o papel das cinases envolvidas no ciclo celular, nomeadamente na fase de transição G1/S.

BIBLIOGRAFIA

1. Gasch, A. P. & Werner-Washburne, M. (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation, *Funct Integr Genomics*. 2, 181-92.
2. Rosen, B. P. (2002) Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 133, 689-93.
3. Rodrigues-Pousada, C., Nevitt, T. & Menezes, R. (2005) The yeast stress response. Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw, *Febs J*. 272, 2639-47.
4. Toone, W. M. & Jones, N. (1998) Stress-activated signalling pathways in yeast, *Genes Cells*. 3, 485-98.
5. Rodrigues-Pousada, C. A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J. & Amaral, C. (2004) Yeast activator proteins and stress response: an overview, *FEBS Lett*. 567, 80-5.
6. Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins, *Annu Rev Genet*. 22, 631-77.
7. Freeman, B. C. & Yamamoto, K. R. (2002) Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones, *Science*. 296, 2232-5.
8. Hightower, L. E. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity, *Cell*. 66, 191-7.
9. Tang, D., Khaleque, M. A., Jones, E. L., Theriault, J. R., Li, C., Wong, W. H., Stevenson, M. A. & Calderwood, S. K. (2005) Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo, *Cell Stress Chaperones*. 10, 46-58.
10. Zhao, M., Tang, D., Lechpammer, S., Hoffman, A., Asea, A., Stevenson, M. A. & Calderwood, S. K. (2002) Double-stranded RNA-dependent protein kinase (pkr) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress, *J Biol Chem*. 277, 44539-47.
11. Hahn, J. S. & Thiele, D. J. (2004) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase, *J Biol Chem*. 279, 5169-76.
12. Hahn, J. S., Hu, Z., Thiele, D. J. & Iyer, V. R. (2004) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor, *Mol Cell Biol*. 24, 5249-56.
13. Mager, W. H. & De Kruijff, A. J. (1995) Stress-induced transcriptional activation, *Microbiol Rev*. 59, 506-31.
14. Mager, W. H. & Ferreira, P. M. (1993) Stress response of yeast, *Biochem J*. 290 (Pt 1), 1-13.
15. Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. & Schuller, C. (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity, *Genes Dev*. 12, 586-97.
16. Schmitt, A. P. & McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 5777-82.
17. Marchler, G., Schuller, C., Adam, G. & Ruis, H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions, *Embo J*. 12, 1997-2003.
18. Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE), *Embo J*. 15, 2227-35.

19. Smith, A., Ward, M. P. & Garrett, S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation, *Embo J.* 17, 3556-64.
20. Treger, J. M., Magee, T. R. & McEntee, K. (1998) Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Biophys Res Commun.* 243, 13-9.
21. Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M. & Hakoshima, T. (2000) Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors, *Nat Struct Biol.* 7, 889-93.
22. Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. & Struhl, K. (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions, *Mol Cell Biol.* 17, 6982-93.
23. Coleman, S. T., Tseng, E. & Moye-Rowley, W. S. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene, *J Biol Chem.* 272, 23224-30.
24. Toone, W. M. & Jones, N. (1999) AP-1 transcription factors in yeast, *Curr Opin Genet Dev.* 9, 55-61.
25. Bossier, P., Fernandes, L., Rocha, D. & Rodrigues-Pousada, C. (1993) Overexpression of YAP2, coding for a new yAP protein, and YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline, *J Biol Chem.* 268, 23640-5.
26. Fong, J. H., Keating, A. E. & Singh, M. (2004) Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions, *Genome Biol.* 5, R11.
27. Wysocki, R., Fortier, P. K., Maciaszczyk, E., Thorsen, M., Leduc, A., Odhagen, A., Owsianik, G., Ulaszewski, S., Ramotar, D. & Tamas, M. J. (2004) Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p, *Mol Biol Cell.* 15, 2049-60.
28. Toda, T., Shimanuki, M. & Yanagida, M. (1991) Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases, *Genes Dev.* 5, 60-73.
29. Alarco, A. M. & Raymond, M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*, *J Bacteriol.* 181, 700-8.
30. Billard, P., Dumond, H. & Bolotin-Fukuhara, M. (1997) Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*, *Mol Gen Genet.* 257, 62-70.
31. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. & Toledano, M. B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast, *J Biol Chem.* 274, 16040-6.
32. Koerkamp, M. G., Rep, M., Bussemaker, H. J., Hardy, G. P., Mul, A., Piekarska, K., Szigartyo, C. A., De Mattos, J. M. & Tabak, H. F. (2002) Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays, *Mol Biol Cell.* 13, 2783-94.
33. Wood, M. J., Storz, G. & Tjandra, N. (2004) Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization, *Nature.* 430, 917-21.
34. Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J. & Gralla, E. B. (1998) The dark side of dioxygen biochemistry, *Curr Opin Chem Biol.* 2, 253-62.
35. Nguyen, D. T., Alarco, A. M. & Raymond, M. (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents, *J Biol Chem.* 276, 1138-45.

36. Schnell, N., Krems, B. & Entian, K. D. (1992) The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism, *Curr Genet.* 21, 269-73.
37. Kuge, S., Jones, N. & Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress, *Embo J.* 16, 1710-20.
38. Wu, A. L. & Moye-Rowley, W. S. (1994) GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation, *Mol Cell Biol.* 14, 5832-9.
39. Haase, E., Servos, J. & Brendel, M. (1992) Isolation and characterization of additional genes influencing resistance to various mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr Genet.* 21, 319-24.
40. Hertle, K., Haase, E. & Brendel, M. (1991) The SNQ3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals, *Curr Genet.* 19, 429-33.
41. Delaunay, A., Isnard, A. D. & Toledano, M. B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor, *Embo J.* 19, 5157-66.
42. Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C. & Toledano, M. B. (2003) Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling, *Free Radic Biol Med.* 35, 889-900.
43. Veal, E. A., Toone, W. M., Jones, N. & Morgan, B. A. (2002) Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Biol Chem.* 277, 35523-31.
44. Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M. & Tohoyama, H. (2000) The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*, *Curr Genet.* 37, 79-86.
45. Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. & Labarre, J. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem.* 276, 8469-74.
46. Hirata, D., Yano, K. & Miyakawa, T. (1994) Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet.* 242, 250-6.
47. Cohen, B. A., Pilpel, Y., Mitra, R. D. & Church, G. M. (2002) Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks, *Mol Biol Cell.* 13, 1608-14.
48. Nevitt, T., Pereira, J. & Rodrigues-Pousada, C. (2004) YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* 21, 1365-74.
49. Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M. & Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes, *J Biol Chem.* 275, 8290-300.
50. Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E. & Arino, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress, *J Biol Chem.* 275, 17249-55.
51. Yan, C., Lee, L. H. & Davis, L. I. (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor, *Embo J.* 17, 7416-29.
52. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. & Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation, *Cell.* 111, 471-81.

53. Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. & Nomoto, A. (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation, *Mol Cell Biol.* 21, 6139-50.
54. Castillo, E. A., Ayte, J., Chiva, C., Moldon, A., Carrascal, M., Abian, J., Jones, N. & Hidalgo, E. (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues, *Mol Microbiol.* 45, 243-54.
55. Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R. & de Larrinoa, I. F. (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance, *FEBS Lett.* 425, 323-8.
56. Delling, U., Raymond, M. & Schurr, E. (1998) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes conferring resistance to quinoline ring-containing antimalarial drugs, *Antimicrob Agents Chemother.* 42, 1034-41.
57. Furuchi, T., Ishikawa, H., Miura, N., Ishizuka, M., Kajiya, K., Kuge, S. & Naganuma, A. (2001) Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Pharmacol.* 59, 470-4.
58. Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K., Hannett, N. M., Harbison, C. T., Thompson, C. M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E. G., Murray, H. L., Gordon, D. B., Ren, B., Wyrick, J. J., Tagne, J. B., Volkert, T. L., Fraenkel, E., Gifford, D. K. & Young, R. A. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science.* 298, 799-804.
59. Glover, J. N. & Harrison, S. C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA, *Nature.* 373, 257-61.
60. Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K. & Harrison, S. C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex, *Cell.* 71, 1223-37.
61. Konig, P. & Richmond, T. J. (1993) The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility, *J Mol Biol.* 233, 139-54.
62. Nehlin, J. O., Carlberg, M. & Ronne, H. (1992) Yeast SKO1 gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription, *Nucleic Acids Res.* 20, 5271-8.
63. Nojima, H., Kimura, I. & Kimura, M. (1994) The evidence of accelerative interaction between cAMP-dependent protein kinase and external calcium for the desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscle cells, *Neurosci Lett.* 167, 113-6.
64. Menezes, R. A., Amaral, C., Delaunay, A., Toledano, M. & Rodrigues-Pousada, C. (2004) Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions, *FEBS Lett.* 566, 141-6.
65. Haugen, A. C., Kelley, R., Collins, J. B., Tucker, C. J., Deng, C., Afshari, C. A., Brown, J. M., Ideker, T. & Van Houten, B. (2004) Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks, *Genome Biol.* 5, R95.
66. Yang, X., Talibi, D., Weber, S., Poisson, G. & Raymond, M. (2001) Functional isolation of the *Candida albicans* FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p, *Yeast.* 18, 1217-25.
67. Ball, C. A., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Scafe, C. R., Sherlock, G., Binkley, G., Jin, H., Kaloper, M., Orr, S. D., Schroeder, M., Weng, S., Zhu, Y., Botstein, D. & Cherry, J. M. (2000) Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database, *Nucleic Acids Res.* 28, 77-80.
68. Winston, F., Dollard, C. & Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C, *Yeast.* 11, 53-5.

69. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. & Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*. *10*, 1793-808.
70. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. (1991) Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier, *Yeast*. *7*, 253-63.
71. Huxley, C., Green, E. D. & Dunham, I. (1990) Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR, *Trends Genet.* *6*, 236.
72. Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. & Hegemann, J. H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* *30*, e23.
73. Lucau-Danila, A., Lelandais, G., Kozovska, Z., Tanty, V., Delaveau, T., Devaux, F. & Jacq, C. (2005) Early expression of yeast genes affected by chemical stress, *Mol Cell Biol.* *25*, 1860-8.
74. Wanke, V., Accorsi, K., Porro, D., Esposito, F., Russo, T. & Vanoni, M. (1999) In budding yeast, reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest, *Mol Microbiol.* *32*, 753-64.
75. Munoz, I., Simon, E., Casals, N., Clotet, J. & Arino, J. (2003) Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*. *20*, 157-69.

Anexo

1. Linhagem bacteriana - *Escherichia coli*

Neste trabalho usou-se como estirpe padrão a *XL-1 Blue* (STRATAGENE-Heidelberg, Alemanha).

1.2 Meios de cultura e condições de crescimento

Escherichia coli (*E. coli*) cresceu a 37°C em LB-Luria-Bertani 2% (m/v) agar (LB: 1% de triptona, 0,5% de extracto de levedura e 0,5% de NaCl). Através do crescimento na presença de 100 µg/mL de antibiótico ampicilina seleccionaram-se os clones recombinantes.

O stock de culturas foi mantido em meio LB agar a 4°C por menos de uma semana ou a -80°C em meio LB contendo 20% (m/v) de glicerol.

1.3 Transformação de *E. coli*

1.3.1 Células competentes

As células de *E. coli* foram colocadas a crescer durante a noite a 37°C em meio LB com agitação para serem usadas num inóculo de 500 mL de meio fresco na manhã seguinte. As células inoculadas cresceram a 37°C com agitação até atingirem uma O.D._{600nm} 0.4 – 0.6. Posteriormente colocaram-se em gelo, centrifugaram-se a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet em 200 µL de 100 mM CaCl₂ refrigerado centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se o pellet em 40 mL de 100 mM CaCl₂ refrigerado e 15% (v/v) de glicerol. A suspensão celular foi dividida em aliquotas de 200 µL, congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C para serem utilizadas mais tarde.

1.3.2 Transformação

Foram usados cerca de 50 µL de DNA plasmidial (+/- 200 ng de DNA) ou mistura de ligação para transformar 200 µL de células competentes. A mistura de transformação foi então incubada em gelo durante 30 minutos e deu-se o choque térmico a 42°C durante 30 segundos. Adicionaram-se 800µL de meio SOC (SOB: 2% de triptona, 0,5% de extracto de levedura, 2,5 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ e 10 mM MgSO₄ + 20 mM glucose) a cada transformação e incubaram-se as células transformadas a 37°C durante 1 hora com agitação antes de se plaquearem em meio selectivo apropriado.

2. *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 Meios de cultura e condições de crescimento

As células foram colocadas a crescer num agitador a 30°C, 200 rpm em meio completo, YPD ou meio selectivo, SC suplementado com os aminoácidos apropriados não essenciais a partir de soluções stock 25X concentradas (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Meios de cultura

	YPD (w/v)	SC (w/v)	SD (w/v)
Extrato de levedura	1 %		
Bactopepetona	2 %		
Glucose	2 %	2 %	2 %
Sulfato de amónia de levedura sem aminoácidos		0,67%	0,67%
Bacto-agar	2 %	2 %	2 %

Tabela 2: Concentração dos aminoácidos usados

L α -arginina-HCl	0,50 g/L	L α -fenilalanina	1,25 g/L
L α -metionina	0,50 g/L	L α -ácido glutâmico	2,50 g/L
L α -tirosina	0,75 g/L	α -valina	3,75 g/L
L α -isoleucina	0,75 g/L	L α -ácido aspártico	2,50g/L
L α -lisina-HCl	0,75 g/L		

Para a selecção de marcadores auxotróficos usou-se meio mínimo sintético, SD suplementado com os aminoácidos selectivos apropriados. As bases (uracilo, adenina) e outros auxotrofismos foram adicionados a partir de soluções stock concentradas 100X para o crescimento selectivo de estirpes:

L α -lisina-HCl	1,00 g/L	L α -histina	1,00 g/L
L α -trionina	2,00 g/L	L α -leucina	1,00 g/L
L α -serina	4,00 g/L	Adenina	0,25 g/L
L α -triptofano	0,50 g/L	Uracilo	0,25g/L

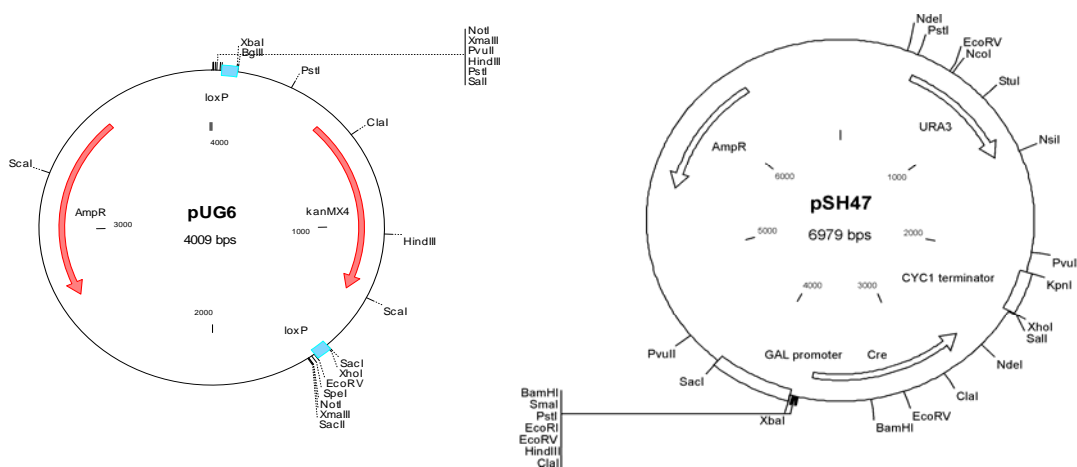
Também foi usado meio CASA-SD com casaminoácidos (caseína hidrolizada) a uma concentração final de 6g/L o qual contem todos os aminoácidos excepto triptofano, adenina e uracilo.

Todos os meios de cultura para levedura e bactéria foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. A solução de glucose foi preparada a 40% e autoclavada a 110°C durante 20 minutos, a solução de casaminoácidos 10X concentrada foi autoclavada a 120°C durante 35 minutos para eliminar vestígios de triptofano presentes. Ambas a soluções foram

adicionadas ao meio antes de ser usado. As soluções stock de aminoácidos e bases foram filtradas e esterilizadas usando um filtro de 20µm.

Stock de culturas *S. cerevisiae* foram mantidas em placas de meio YPD sólido a 4°C ou em YPD contendo 40% (m/v) de glicerol a -80°C.

3. Plasmídeos usados neste estudo



4. Condições das reacções de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Na etapa de geração da cassette de interrupção *loxP*-*kanMX4*-*loxP* as condições de PCR foram as seguintes: 1-10ng pUG6, 40µM de cada primer S1 e S2, 200µL de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP and dGTP), 2mM MgCl₂ e 2.5U *Taq* polimerase (Invitrogene) em tampão de reacção 1X (Invitrogene). O volume de reacção foi preenchido até 50 µL com água destilada estéril e o programa de PCR usado foi: 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 90 segundos a 72°C, com uma incubação final de 10 minutos a 72°C.

Na etapa de verificação da substituição correcta do gene correspondente foram usados 25 µL de reacção de PCR (1X tampão da reacção (Invitrogene), 40 µM de cada primer interno A2/k2 ou A3/k3, 10pmol de cada primer externo A1 ou A4, 200µL de cada desoxinucleótido e 2.5U de *Taq* polimerase (Invitrogene), 2mM MgCl₂). O programa de PCR usado foi: 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 45°C e 90 segundos a 72°C, com uma incubação final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 3: Primers usados neste trabalho.

NOME	SEQUÊNCIA
S1yap1	5'-ccacccaaaacgtttaagaaggaaaagttcgtacgctgcaggctgcac-3'
S2yap1	5'-gaaaaagtcttttcggttaccagtttccatcgatgaattcgagctcg-3'
S1yap2	5'-ttaaggacgacataataagcaatggaacgaccagtttaagataaatgcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap2	5'-tctcatccaacattatgtatactcaagatatgtttatatgctagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap3	5'-cttcaggtataaactaacgaagaataaggctgaagcaattgttatgcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap3	5'-ctttcttatttagtgtttgtaagtatttttgcagaagtctattcagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap4	5'-gaataacagcttggacaagaaggaaaaccgcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap4	5'-gaaaacttttaagatgttactagtactaaagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap5	5'-cacacaacataaacagtgtaactagcatatgcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap5	5'-gttcaatgacgtatttataagtatttaagaaagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap6	5'-gaaatttcaataaacaacagaataacgaaggcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap6	5'-cttcaggtactagagatcaatatctgtccagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap7	5'-cacaaaattttgtcatttacgcacacttccgcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap7	5'-caaagactggctctgttaataaccgcgggcacagcataggccactagtggatctg-3'
S1yap8	5'-gttgaaaaaacatgtcaaacggaagataagcagctgaagcttcgtacgc-3'
S2yap8	5'-caataagaagacaatgttgcgctgtgcttagcataggccactagtggatctg-3'
K2	5'-ctgaccatctcatctgtaac-3'
K2c	5'-cgtccaacatcaacatcaatacacc-3'
K3	5'-ggttgattgatgttgacg-3'
K3c	5'-gttacagatgagatgggtcag-3'
A1yap1	5'-gctgatcttaccgtgttg-3'
A2yap1	5'-ctcggaaacataaaccatc-3'
A3yap1	5'-ccatgagtgtgtgtctaccg-3'
A4yap1	5'-tctcagcgttggtccatc-3'
A1yap2	5'-gcaatacctggcatgtgatt-3'
A2yap2	5'-gagctgtctaaccagagc-3'
A3yap2	5'-ggaaaaggtcaagcaaatat-3'
A4yap2	5'-tgaaaatgatgtccatgtc-3'
A1yap3	5'-cctaagactgtttgtattag-3'
A2yap3	5'-gcttccctcactagaaaatc-3'
A3yap3	5'-ccttctaatatggatgat-3'
A4yap3	5'-gaacttttacttaatccg-3'
A1yap4	5'-gcatacattaccaagttc
A2yap4	5'-tctttcatcaagccatcg-3'
A3yap4	5'-gcatacattaccaagttc-3'
A4yap4	5'-gctcatgacaacattcg-3'
A1yap5	5'-caaaactgtggtgttag-3'
A2yap5	5'-gatgtcgatacatgatttg-3'
A3yap5	5'-gctctacctctgaataaag-3'
A4yap5	5'-gaatgtataggcatagtaag-3'
A1yap6	5'-gattccattctgtcatatc-3'
A2yap6	5'-ttacgtggcactatccga-3'
A3yap6	5'-atgcaaaacctccgttg-3'
A4yap6	5'-tatgtgtgtgcgtgagtc-3'
A1yap7	5'-cagcatcttatgagctg-3'
A2yap7	5'-gttttctggctgctgttg-3'
A3yap7	5'-gctctacctctgataaag-3'
A4yap7	5'-gttattcttttggttg-3'
A1yap8	5'-cctacttacaagaagaag-3'
A2yap8	5'-gacgaaaagaccttaatg-3'
A3yap8	5'-gaagccttcacttactc-3'
A4yap8	5'-cttgccctccaatttg-3'

5. Stock de soluções

- Solução **TE/LiAc (1X/100 mM)** preparada a partir de um stock 10X concentrado: 10XTE = 0.1M Tris-HCl, 0.01M EDTA, pH 7.5; 10XLiAc = 1M LiAc pH 7.5 ajustado com ácido acético diluído.
- Solução **40% PEG 3350** preparada a partir de um stock de soluções: 50% PEG 4000, 10X TE, 10X LiAc, 8:1:1 v/v, pH7.5.
- **Tampão Laemmli**: 62,5 mM TrisCl pH 8.7, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.01% azul bromofenol.
- **Tampão de transferência**: 20 mM Tris, 150 mM glicina e 20% (v/v) de metanol.
- Solução **Ponceau S**. preparada a partir de um stock 10X concentrado de Ponceau S (2% (w/v), 30% (w/v) TCA e 30% (w/v) de ácido sulfosalicílico e diluída 1:10 com água destilada estéril.